

**Budapesti Corvinus Egyetem**  
**Élelmiszertudományi Kar**  
**Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék**



***LISTERIA MONOCYTOGENES* STRESSZ ADAPTÍV VÁLASZAINAK  
TANULMÁNYOZÁSA**

**Ágoston Réka**  
**Doktori értekezés tézisei**

**Budapest**

**2009**

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Fodor Péter, DSc  
Egyetemi tanár  
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar  
Alkalmazott Kémia Tanszék

**Témavezető:** Mohácsiné Farkas Csilla, PhD  
Egyetemi docens  
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar  
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

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



.....  
Az iskolavezető jóváhagyása



.....  
A témavezető jóváhagyása

## BEVEZETÉS

A patogén baktériumok, valamint toxinok okozta élelmiszer eredetű megbetegedések világszerte egyre növekvő problémát jelentenek. Az élelmiszereket szennyező mikroorganizmusok általános szennyeződési forrásokból, mint például a talajból, vízből, levegőből illetve a helytelenül tisztított feldolgozó eszközökről, berendezésekről származnak, az élelmiszerlánc egészén, a “földtől a villáig” bármely ponton előfordulhatnak. A patogének gátlása és eltávolítása, valamint az eltarthatóság növelése érdekében az élelmiszeripar számos eljárást önmagában vagy más eljárásokkal kombináltan alkalmaz illetve fejleszt ki. Ilyen eljárások például a hőmérséklet növelése vagy csökkentése, a gázösszetétel megváltoztatása a csomagoláson belül, besugárzás alkalmazása, a vízaktivitás csökkentése, a pH csökkentése, az oxigén eltávolítása, valamint bakteriocinek és tartósítószer alkalmazása. Az élelmiszer eredetű patogének tartósító eljárásokra illetve stresszt kiváltó tényezőkre adott stressz válaszai kiemelt figyelmet érdemelnek. Számos stresszhatás nagyobb túlélési arányt, megnövekedett virulenciát, vagy akár több stressztényezővel szembeni keresztvédelmet eredményezhet.

A hőkezelés még mindig az ipar által leggyakrabban alkalmazott élelmiszer tartósítási eljárás és egyúttal a legrészletesebben vizsgált stresszhatás is. A szubletális hőstressz (hősokk) vagy a hőkezelést megelőző, de az optimális szaporodási hőmérséklet feletti enyhe hőkezelés megnövekedett hőtűrészt idézhet elő az azt követő – normál körülmények között letális hatású – hőkezeléssel szemben. Ezt a fajta stressz választ a szakirodalom indukált hőtűrésnek nevezi, melynek gyakorlati jelentősége az élelmiszer előállítók számára abban az esetben kiemelt, amennyiben 65°C alatti hőmérsékletet alkalmaznak a feldolgozás, tartósítás során. Azon húsipari termékeknél, ahol a termék hosszabb ideig áll melegítő tálcákon a végső hőkezelés, vagy újramelegítés előtt, a hőtűrésnek nagy szerepe lehet. A hőkezelési eljárás során fellépő probléma (berendezések meghibásodása) szintén hőtűrészt indukálhat.

A *Listeria monocytogenes* a természetben általánosan elterjedt baktérium, mely számos stresszel (melegítés, hűtés, sózás, pH csökkentése) szemben genetikailag kódolt túlélési mechanizmussal rendelkezik. Hőstresszre adott válaszainak, valamint megnövekedett hőtűrésének a fogyasztásra kész, ún. Ready-To-Eat élelmiszerek esetében van jelentősége, különös tekintettel arra, hogy a patogén által okozott halálozási arány igen nagy.

## CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során a *L. monocytogenes* szubletális hőstresszre adott válaszainak jobb megértését tűztem ki célul. A munka részeként szintén célom volt a *L. monocytogenes* friss termékeken történő elszaporodásának gátlása érdekében kis dózisú gamma sugárzás és a módosított atmoszférás csomagolás kombinált alkalmazásának vizsgálata.

Kutatómunkám alapfeltevése az volt, hogy a *L. monocytogenes* szubletális hőstresszre adott stressz adaptív válaszában részeként sajátos fiziológiai, genom és proteom szintű válaszokkal rendelkezik. Ennek alátámasztása érdekében a következő célok megvalósítását határoztam meg:

1. *L. monocytogenes* friss termékeken történő szaporodásának gátlása érdekében a kis dózisú  $\gamma$ -sugárzás és a módosított atmoszférás csomagolás (MAP) kombinált alkalmazhatóságának vizsgálata
2. *L. monocytogenes* szubletális hőstresszre adott fiziológiai válaszainak megértése
3. *L. monocytogenes* szubletális hőstresszre adott válaszainak tanulmányozása transzkriptom szinten
4. *L. monocytogenes* szubletális hőstresszre adott válaszainak megértése proteom szinten.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mikroorganizmusok: A vizsgálatokba két *Listeria monocytogenes* törzset vontam be. Az avirulens (eredetileg húsipari termékről izolált) *L. monocytogenes* 4ab törzset (No. 10) munkám első felében, a gamma sugárzásos és a hőtűrés vizsgálatok során alkalmaztam. A virulens *L. monocytogenes* ATCC 43256 törzs 60°C-os (előkezeléssel és előkezelés nélkül) hőkezelésre adott válaszainak fiziológiai, transzkriptom és proteom szintű vizsgálatait a Texas A&M Egyetemen (USA) végeztem el. Ezzel a törzssel tanulmányoztam a patogén élő, de nem tenyészhető (Viable But Non-Culturable, VBNC) állapotát is.

Frissen szeletelt termékek és a módosított atmoszférás csomagolási (MAP) feltételek: A friss lucerna és retek csírákat a helyi bio-boltból szereztem be Budapesten. Öt-öt gramm lucerna illetve retek csírákat CombiTherm80 típusú tasakba csomagoltam, majd két különböző

gázösszetétellel töltöttem meg azokat: 1. gázösszetétel (2% oxigén, 4% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>) és 2. gázösszetétel (3-5 % oxigén és 10-15% CO<sub>2</sub>, nitrogénnel kiegészítve).

Besugárzási feltételek: A besugárzásos kísérleteket 1 kGy és 2 kGy sugárdózissal, NORATOM Co<sup>60</sup> gamma sugárzó berendezéssel (Radiobiológiai Intézet, Budapest) szobahőmérsékleten végeztem el. A  $\gamma$ -sugárzás dózisteljesítménye 6,47 kGy/h volt. A besugárzást követően a mintákat 5 °C-on tároltam.

D-értékek meghatározása: A vizsgálatba vont 24 órás tenyészetet centrifugáltam, majd foszfát pufferben kétszer mostam, ezt követően a sejteket TSB (Tryptic Soy Broth) táplevesbe, mint hőkezelő közegbe vettem vissza. Az így nyert szuszpenziót Eppendorf csövekbe mértem. A mintákat hőmérséklet-szabályozós, cirkuláltatott vízfürdőben hőkezelttem 55°C-on (10, 20, 30, 40, 50 és 60 percig), 60°C-on (3, 6, 9, 12, 15 és 18 percig) és 65°C-on (1, 2, 3, 4, 5 és 6 percig). Az 55°C-on, 60°C-on és 65°C-on kapott D-értékeket a túlélési görbék lineáris szakaszára illesztett egyenesekből határoztam meg.

Megnövekedett hőrezisztencia vizsgálata: A szubletális hőstressz vizsgálatánál alkalmazott idő-hőmérséklet kombinációk a következők voltak: 46°C (30 és 60 perc), 48°C (30 és 60 perc), és 50°C (30 és 60 perc). A korábban kapott D-értékek alapján a további kísérletekhez a 60°C-os hőkezelést választottam ki. A mosott, majd TSB táplevesbe felvett sejtek szuszpenziójának azonos mennyiségeit a fent említett szubletális hőstresszeknek tettem ki, majd ezt követően a mintákat azonnal 60°C-os vízfürdőbe helyeztem át, ahol 3, 6, 9, 12 és 15 percig végeztem a hőkezelést. A hőkezelést követően a mintákat jégen hűtöttem, majd tizedelő hígítási sort készítettem pepton-só (0.85 %) oldattal. A leoltásokat TSA (Tryptic Soy Agar) agaron, valamint 5% NaCl-dal kiegészített TSA agaron végeztem el. Korábbi, szakirodalmi adatok alapján azt feltételeztem, hogy a sérült sejtek érzékenyek az 5% NaCl koncentrációval szemben, így a TSA agarról, valamint a TSA+NaCl agarról leolvasott értékek különbségéből következtettem a sérült sejtek arányára.

VBNC állapotú *L. monocytogenes* tanulmányozása: A virulens *L. monocytogenes* (ATCC 43256) sejteket a már korábban leírt módon mostam, majd Luria Bertani (LB) táplevesbe vettem vissza. A szuszpenzió azonos mennyiségeit Eppendorf csövekbe mértem a különböző hőkezelésekhez. A hőkezeléseket kalibrált vízfürdőben végeztem el, három kísérleti elrendezésben. A hőkezeléseket követően a mintákat centrifugáltam, mostam, majd steril desztillált vízbe vettem vissza. Az életképességet mikroszkópikusan, valamint fluorométer segítségével határoztam meg. A sejteket a kereskedelmi forgalomban kapható LIVE/DEAD

BacLight™ fluoreszcens festékkel vizsgáltam. A fluoreszcens spektroszkópiás vizsgálatokhoz frissen készített, két festéket tartalmazó oldatot használtam, amelyet a 96-férőhelyes microtiter lemez hőkezelt mintákat tartalmazó celláiba pipettáztam, ezt követően 15 percig sötétben inkubáltam. Az inkubációs idő eltelte után a minták fluoreszcenciáját két hullámhosszon ( $A_{535}$  és  $A_{635}$ ) mértem fluorométer segítségével. A zöld/piros fluoreszcencia értékek arányát ( $R_{G/R}$ ) ( $A_{535}/A_{635}$ ) minden egyes mintára nézve meghatároztam. A direkt mikroszkópos vizsgálatához a mintákat előzetesen a két festéket tartalmazó oldattal festettem, majd inkubáltam. A vizsgálatokat fluoreszcens mikroszkóppal végeztem el, a képeket a mikroszkóphoz csatlakoztatott nagy felbontású CCD kamera segítségével rögzítettem. Az élő és holt sejtek arányát képanalízis segítségével határoztam meg, ahol a zöld (élő) sejtek és a piros (holt) sejtek arányát a zöld és piros pixelek számának hányadosából határoztam meg. A zöld és a piros pixeleket 100-as pixel intenzitás felett fogadtam el, következtetve ebből az élő és holt sejtek számára.

Microarray analízis: A virulens *L. monocytogenes* (ATCC 43256) törzs hőstressz hatására eltérően expresszáldott génjeinek azonosítására microarray technikát alkalmaztam. A vizsgálatokba négy hőkezelési paramétert vontam be: (i) 37°C (kontroll), (ii) hősokk (60°C, 0 perc), (iii) 60°C-os 9 perces hőkezelés, valamint (iv) hőtűrést indukáló feltételek (48°C-os 30 perces enyhe hőstressz és 60°C-os 9 perces hőkezelés együttes alkalmazása); a hőkezeléseket kalibrált vízfürdőben valósítottam meg.

*RNS extrakció, cDNS szintézis, hibridizáció és adatanalízis:* Az összes mikrobiális RNS extrakciója a hőkezelt mintákból kereskedelmi forgalomban kapható RNS extrakciós kit segítségével történt. A cDNS szintézis, a jelölés és a hibridizáció a The Institute of Genomic Research (TIGR, USA) intézet által leírt protokoll alapján történt, kisebb módosításokkal. Az összes RNS reverz transzkripcióval cDNS-sé történő szintéziséhez random primert használtam. A mintákból nyert, tisztított cDNS-t Cy-3 és Cy-5 festékekkel jelöltem. A kezelésből származó és a kontroll minta jelölt cDNS-ét *L. monocytogenes* genom microchiphez hibridizáltam (cDNA chip 2846 nyitott leolvasási kerettel, ORF-enként 4 ismétlődő hellyel). A hibridizációt egy éjszakán keresztül, 42°C-on végeztem, ezt követően a lemezeket mostam, majd 532 nm-en (Cy3) és 635 nm-en (Cy5) szkenneltem. A négy-öt kísérletből származó adatot (a méréseket kezelésként 4-5 párhuzamosban végeztem el, a festékek cseréjével) előzetesen szűrtem a pontok minőségét tekintve (jel egységessége, jel-háttér arány, intenzitás határértékének figyelembevételével). Ezt követően az adatok normalizálása és a szignifikancia meghatározása történt meg. A különböző kezelések hatására

eltérően expresszálódott gének azonosítása Student-féle t-tesztel történt, valamint a hamis találati arány (False Discovery Rate, FDR) is meghatározásra került. Azokat a géneket tekintetem eltérően expresszálódottnak a kezelt és a kontroll minta között, amelyek  $FDR < 0,05$  értékkel rendelkeztek.

Fehérjeanalízis: A virulens *L. monocytogenes* (ATCC 43256) törzs vizsgálatával tanulmányoztam a patogén hőstresszre adott fehérje szintű válaszát a négy, már korábban említett kísérleti feltétel alkalmazásával. A fehérjefrakciók kinyeréséhez kereskedelmi forgalomban kapható kitet használtam szonizálással és ultraszonikus sejtroncsoló kombinálásával. A fehérjét ezt követően tisztítottam, majd meghatároztam a koncentrációkat. Az első dimenziós elektroforézisnél az izoelektromos fókuszálás 7 cm-es és 11 cm-es IPG csíkok segítségével történt, lineáris feszültségnövelés (24.000 V-h illetve 56.000 V-h végső feszültség) mellett. A második dimenziós elektroforézist 10% SDS–poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) gél alkalmazásával valósítottam meg. A fehérjemintázatot kereskedelmi forgalomban kapható festék segítségével tettem szabad szemmel láthatóvá és az így kapott gélből történt a fehérjék kivágása.

Adatanalízis: A gélek szkennelése és elemzése kereskedelmi forgalomban kapható szoftver segítségével történt. A hőstressz hatására kialakult fehérje mintázat tanulmányozása a kontroll (kezeletlen) minta fehérje mintázatának összevetésével történt meg; a kísérletbe bevont kezelések a következők voltak: (i) 60°C, 0 perc, (ii) 60°C-os 9 perces hőkezelés, valamint (iii) 48°C-os 30 perces enyhe hőstressz és 60°C-os 9 perces hőkezelés együttes alkalmazása. Kizárólag azok a pontok kerültek tovább MALDI-TOF azonosításra, ahol a pont intenzitása  $\pm 1,5$ -szeres különbséget mutatott.

MALDI-TOF azonosítás: A kiválasztott fehérjéket a gélből manuálisan vágtam ki, majd tripszinnel emésztettem. Az emésztett mintákat mátrix közvetítésével végzett lézer deszorpciós ionizációnak (MALDI) vettem alá. Az egyes fehérjékre vonatkozó tömegspektrometriás (MS) adatokat reflexiós detektor és pontonként 20 tandem MS spektrum alkalmazásával határoztam meg. Az összes MS és MS/MS adatot kereskedelmi forgalomban elérhető szoftver segítségével a Swiss-Prot fehérje szekvencia adatbázisból kértem le. A MALDI-MS adatok reprodukálhatóságának igazolása érdekében 10 fehérje analízisét megismételtem.

## EREDMÉNYEK

### Kis dózisú $\gamma$ -sugárzás és MAP hatásának vizsgálata friss termékek eltarthatóságának növelésére, *Listeria monocytogenes* túlélésének és szaporodásának tanulmányozására:

A módosított atmoszférás csomagolású retek és lucerna csíra kezdeti összes mikrobaszáma (az 1. és a 2. gázösszetétel mellett egyaránt) megközelítőleg  $10^9$  TKE/g volt. A baktériumok nagy része az *Enterobacteriaceae* családba tartozott. A tejsavbaktérium szám 2 nagyságrenddel nagyobb volt retek csírán. A 10 napos, 5°C-os tárolás során (a csomagolásban megnőtt CO<sub>2</sub> tartalomnak köszönhetően) a tejsavbaktérium szám egy nagyságrenddel nőtt, míg az *Enterobacteriaceae* szám nem változott. Az 1. gázösszetétel hatékonyabbnak tűnt a mikrobaszám csökkentésében. A 2. gázösszetétel nem csökkentette, de nem is növelte a kiindulási mikrobaszámot. A módosított atmoszférás csomagolás (MAP) és a gamma sugárzás (1 és 2 kGy) kombinált alkalmazása csökkentette a lucerna és retek csíra összes mikrobaszámát és az *Enterobacteriaceae* számot. A *L. monocytogenes* 4ab D<sub>10</sub>-értéke 0,58 kGy volt az 1. gázösszetételű és 0,45 kGy a 2. gázösszetételű csomagolás esetén. A kis dózisú gamma sugárzás kevésbé tűnt hatékonynak az 1. gázösszetételű csomagolás mellett, a kontrollhoz képest (D<sub>10</sub>=0,46 kGy). A *L. monocytogenes* képes volt szaporodni MAP csomagolásban, 1 kGy sugárdózis alkalmazását követően; száma 2 nagyságrenddel nőtt a hűtve tárolás során.

Megnövekedett hőrezisztencia vizsgálata: A *L. monocytogenes* 4ab D-értékeit 55°C-on, 60°C-on, és 65°C-on a következőknek határoztam meg: 15,19 perc (R<sup>2</sup>=0,93), 3,03 perc (R<sup>2</sup>=0,98) és 1,29 perc (R<sup>2</sup>=0,947). A 30 illetve 60 perces szubletális hőmérsékleten történt kezelés a D-érték növekedését idézte elő 60°C-on. A D<sub>60</sub>-érték 46°C-os, 30 perces enyhe hőstressz következtében 5,24 percre, 60 perces enyhe hőstressz következtében 16,18 percre adódott. Hasonlóképpen a 48°C-os 30 perces és 60 perces szubletális hőstressz hatására a D<sub>60</sub>-érték 6,72 perc és 14,83 perc; 50°C alkalmazása esetén 13,88 perc és 11,16 perc volt. A *L. monocytogenes* 4ab hőrezisztenciájában növekvő tendencia volt megfigyelhető a 46°C, 48°C és 50°C hőmérsékleten alkalmazott 30 perces szubletális hőstressz esetén. Az 50°C-os, 30 perces hőstressz a D<sub>60</sub>-értéket 5,24 percről (46°C, 30 perc hőstressz) 13,88 percre növelte. A 60 perces hőstressz azonban már csökkentette a baktérium túlélését. Összehasonlítva a 46°C-os 60 perces, valamint az 50°C-os 60 perces szubletális hőstressz eredményezte D<sub>60</sub>-érték növekedést, csökkenő tendencia volt megfigyelhető (16,18 percről 11,16 percre). A szubletális hőstressz sérült *L. monocytogenes* sejtek jelenlétét



is eredményezte (tekintve a TSA és a NaCl-dal kiegészített TSA táptalajon történt tenyésztés eredményeit a 46°C, 48°C és 50°C hőmérsékleten alkalmazott 30 illetve 60 perces szubletális hőstressz esetén). Szignifikáns különbség volt megfigyelhető a telepkepző egységek számában, attól függően, hogy azt a TSA lemezekről vagy a NaCl-dal kiegészített TSA lemezekről olvastam le. A direkt 60°C-os hőkezelést követően az 5%-ban NaCl-ot is tartalmazó TSA lemezekről, valamint a TSA lemezekről leolvasott értékek között nem volt különbség.

#### Hőstressz hatására kialakult VBNC állapotú *L. monocytogenes* tanulmányozása:

A *L. monocytogenes* ATCC 43256 törzs D-értéke 55°C-on, 60°C-on és 65°C-on rendre 17,39 perc ( $R^2=0,95$ ), 3,74 perc ( $R^2=0,96$ ), 3,15 perc ( $R^2=0,89$ ) volt. A 48°C-os, 30 perces szubletális hőmérsékleten történt kezelés a D-érték növekedését idézte elő 60°C-on, a  $D_{60}$ -érték a virulens *L. monocytogenes* esetében 3,7 percről 4,6 percre nőtt. A 60°C-os 9 perces hőkezelés 2 log<sub>10</sub> (~99%) csökkenést mutatott a tenyésztéses vizsgálatok alapján. A 60°C-os 9 perces hőkezelést megelőző 48°C-os 30 perces enyhe hőkezelés eredményeképpen <2 log<sub>10</sub> (99%) csökkenés volt megfigyelhető. Szignifikáns különbség mutatkozott a tenyésztéses vizsgálattal és a Live/Dead BacLight™ fluoreszcens festési módszerrel végzett, direkt életképességi vizsgálattal kapott eredmények között. A 60°C-os 9 perces hőkezelés hatására szinte a sejtek 100%-a életképesnek mutatkozott fluoreszcens spektroszkópia alkalmazásával, míg fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal ez az érték minimális csökkenést mutatott (1,03%). Hőtűrést indukáló feltételek (48°C-os 30 perces enyhe hőstressz és 60°C-os 9 perces hőkezelés együttes alkalmazása) esetén a mikroszkópos vizsgálattal 0,91% csökkenés volt tapasztalható az életképességben.

#### *L. monocytogenes* hőstressz hatására kialakult génexpressziós mintázatának tanulmányozása:

A vizsgálatok során: (i) hősokk (60°C, 0 perc) hatására a 6347 génből 91 (~1,4%) expresszáldott eltérően, 55 gén aktiválódott és 36 gén volt gátolt, (ii) 60°C 9 perces hőkezelés hatására a 6347 génből 80 expresszáldott eltérően (1,2%) ( $p \leq 0,05$ ), 20 gén aktiválódott és 60 gén volt gátolt, (iii) hőtűrést indukáló feltételek (48°C-os 30 perces enyhe hőstressz és 60°C-os 9 perces hőkezelés együttes alkalmazása) hatására 71 gén (1,1%) expresszáldott eltérően, 17 gén aktiválódott és 54 gén volt gátolt. A legtöbb aktivált gén (az adott kezelésre nézve eltérően expresszáldott gének 60%-a) hősokk hatására (60°C, 0 perc) volt megfigyelhető, szemben a gátolt génekkel, amelyek a 60°C-os 9 perces hőkezelés esetében az összes eltérően expresszáldott gén 75%-át, 48°C-os 30 perces enyhe hőstressz

és 60°C-os 9 perces hőkezelés együttes hatása esetén a 76%-ot tette ki. Mindössze tíz gén expresszáldott mindhárom kezelésnél. Egyetlen gén (hipotetikus fehérjét kódoló gén, amelynek funkciója ismeretlen) volt közös a 60°C-os 9 perces hőkezelés és a hőtűrést indukáló feltételek (48°C-os 30 perces enyhe hőstressz és 60°C-os 9 perces hőkezelés együttes alkalmazása) esetén, bár ez a gén hőtűrést indukáló feltételek mellett aktivált, míg a 60°C-os 9 perces hőkezelés esetében gátolt volt. A többi 9 gén hasonló expressziós mintázatot mutatott mind hősokk (60°C, 0 perc), mind a 60°C-os 9 perces hőkezelés esetén.

*L. monocytogenes* hőstressz hatására kialakult fehérje expressziós mintázatának vizsgálata:

A vizsgálatok során szoros vágási értéket választottam a pontos fehérje azonosítás érdekében, kizárólag a 95%< konfidencia intervallumba eső fehérjéket azonosítottam, a konfidencia intervallumon kívül eső fehérjéket nem tekintettem azonosíthatónak. A hősokk (60°C, 0 perc), 60°C-os 9 perces hőkezelés, valamint hőtűrést indukáló feltételek (48°C-os 30 perces enyhe hőstressz és 60°C-os 9 perces hőkezelés együttes alkalmazása) hatására összesen 47 eltérően expresszáldott ( $\pm 1,5$ -szeres  $\leq$  eltérés mellett) fehérjéből 24 fehérje nem volt azonosítható az általam alkalmazott technikával. Tizennyolc fehérje expresszáldott eltérően hősokk (60°C, 0 perc) hatására (6 túlexpresszáldott, 12 csökkenten expresszáldott); a 18 fehérjéből 6 nem volt azonosítható. Az egyik fehérje, a Chaperonin GroEL (hősokkfehérje) mintegy 4-szeresen csökkent expressziót mutatott. A 60°C-os 9 perces hőkezelés 21 fehérje eltérő expresszióját eredményezte (12 túlexpresszáldott, 9 csökkenten expresszáldott), az egyik azonosítatlan fehérje (60,9 kDa) 6,8-szorosan túlexpresszáldott. A 48°C 30 perces enyhe hőstressz alkalmazása a 60°C, 9 perces hőkezelést megelőzően 20 fehérje (10 túlexpresszáldott, 10 csökkenten expresszáldott) eltérő expresszióját eredményezte; az egyik azonosítatlan fehérje (29,2 kDa) 12-szeresen túlexpresszáldott. Egyetlen 50 kDa molekulású fehérje volt közös a három kezelés során eltérően expresszáldott fehérjék közül; a 60°C, 0 perc és a 60°C-os 9 perces hőkezelés során eltérően expresszáldott fehérjék között egy közös sem volt található. Egyetlen fehérje, a szénhidrát transzportban és metabolizmusban szerepet játszó tagatóz-1,6-difoszfát aldoláz túlexpressziója volt megfigyelhető mind hősokk (60°C, 0 perc), mind hőtűrést indukáló feltétel mellett. Nyolc fehérje (19 kDa és 62,5 kDa molekulású között) mutatott eltérő expressziót hőtűrést indukáló feltétel és 60°C-os 9 perces hőkezelés mellett is, bár egyik sem volt azonosítható.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A módosított atmoszférás csomagolás (MAP) és a 2 kGy gamma ( $\gamma$ ) sugárzás kombinált alkalmazása csökkenti a friss lucerna és retek csíra természetes mikrobiotáját, növeli a mikrobiológiai biztonságot és hosszabb eltarthatóságot eredményez. A *Listeria monocytogenes* 4ab D-értéke lucernacsírán 0,46 kGy 3-5% O<sub>2</sub>, 10-15% CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>-vel kiegyenlített légtérben, míg 2% O<sub>2</sub>, 4% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub> gázösszetétel mellett 0,58 kGy.
2. Megállapítottam, hogy a szubletális hőhatás megnövekedett hőrezisztenciát okoz a vizsgált *L. monocytogenes* törzsek (4ab és ATCC 43256) esetében. A 48°C, 30 perces enyhe hőstressz megnövekedett rezisztenciát eredményezett a 60°C-os hőkezeléssel szemben *L. monocytogenes* 4ab és *L. monocytogenes* ATCC 43256 esetében. A *L. monocytogenes* 4ab D<sub>60</sub>-értéke 3,03 percről 6,72 percre, a *L. monocytogenes* ATCC 43256 D<sub>60</sub>-értéke 3,74 percről 4,55 percre nőtt.
3. Vizsgálataim alapján bizonyítást nyert, hogy a szubletális hőstressz a direkt hőhatáshoz képest *Listeria monocytogenes*-ben eltérő génexpressziót okoz. Az optimális hőmérsékleti körülményekhez (37°C) viszonyítva hősokk hatására (60°C, 0 perc) a *L. monocytogenes* transzkriptomban 55 gén aktiválása volt megfigyelhető. A 60°C-os 9 perces hőkezelés 20 gén, a 48°C 30 perces enyhe hőstressz alkalmazása a 60°C, 9 perces hőkezelést megelőzően 17 gén aktiválását eredményezte.
4. Elsőként igazoltam, hogy a szubletális hőmérséklet (48°C, 30 perc) egyedi, hőstresszel kapcsolatba hozható fehérjék túlexpresszióját indukálta *L. monocytogenes* ATCC 43256 törzsben. Tizennyolc fehérje eltérően expresszálódott 60°C, 0 perc hatására; a 60°C-os 9 perces hőkezelés 21 fehérje, a 48°C 30 perces enyhe hőstressz alkalmazása a 60°C, 9 perces hőkezelést megelőzően 20 fehérje eltérő expresszióját eredményezte.
5. Megállapítottam, hogy a *L. monocytogenes* ATCC 43256 szubletális hőmérsékleti feltételek mellett képes élő, de nem tenyészthető (VBNC) formává alakulni. A 60°C, 9 perces hőkezelést megelőző 48°C 30 perces enyhe hőstressz hatására tenyésztési módszerrel a sejtek csupán 1 %-a, míg mikroszkópos módszerrel több, mint 99%-a bizonyult életképesnek.

## JAVASLATOK

1. További vizsgálatok szükségesek a friss termékek módosított atmoszférás csomagolási feltételeinek optimálására annak érdekében, hogy a MAP alkalmas legyen az esetlegesen túlélő patogének - mint például a *L. monocytogenes* - szaporodásának gátlására a tárolás során.
2. Hőkezelt élelmiszerek *L. monocytogenes* szennyezettségének meghatározásakor különös figyelmet kell fordítani a tápközeg megválasztására abból a célból, hogy kiküszöböljük a VBNC állapotban lévő mikroorganizmusoknak tulajdonítható félrevezetően alacsony mikrobaszámot.
3. Eredményeim alapján megállapítható, hogy a jelenleg *Listeria* fajok detektálására alkalmazott tenyésztési módszerrel szignifikánsan alábecsülhető az élő patogén baktérium száma hőkezelt termékekben. Ezért további célzott (élelmiszer mintákban végzett) kísérletekre van szükség a *Listeria monocytogenes* VBNC állapotának megértése, valamint a VBNC állapotban lévő sejtek detektálására alkalmas módszer kifejlesztése érdekében.
4. A *Listeria monocytogenes* különböző tartósítási eljárások hatására specifikus változásokat mutathat a patogenitási funkcióban, virulenciában vagy fenotipusosan. Ezek funkcionális genomikai, valamint proteomikai hátterének jobb megértése segíthet hatékony új technológiák tervezésében.
5. A microarray, valamint a proteomikai kutatásokhoz kapcsolódó prediktív modellezés, bioinformatikai eszközök alkalmazása nagyban segíthet a *Listeria monocytogenes* tartósító eljárások során bekövetkező ökológiai változásainak megértésében.

## PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

### IF-es folyóirat cikk

Senses-Ergul, S., Ágoston, R., Belák, Á., Deák, T. (2006): Characterisation of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology* 108, 120-124. (IF/2006: 2.608)

Friedrich, L., Siró, I., Dalmadi, I., Horváth, K., Ágoston, R. and Balla, Cs. (2007): Influence of various preservatives on the quality of minced beef under modified atmosphere at chilled storage. *Meat Science* 79 (2), 332-343. (accepted 13 October 2007) (Impact factor 2007: 2.006)

Ágoston, R., Soni, K. A., McElhany, K., Cepeda, M. L., Zuckerman, U., Tzipori, S., Mohácsi-Farkas, Cs., Pillai, S. D. (2009): Rapid concentration of *Bacillus* and *Clostridium* spores from large volumes of milk, using continuous flow centrifugation. *Journal of Food Protection* 72 (3), 666-668. (accepted 9 October 2008) (Impact factor 2008: 1.264)

Ágoston, R., Soni, K., Jesudhasan, P. R., Russell, W. K., Mohácsi-Farkas, Cs. and Pillai, S. D. (2009): Differential expression of proteins in *Listeria monocytogenes* under thermo tolerance-inducing, heat shock, and prolonged heat shock conditions. *Foodborne Pathogens and Disease*, In press (accepted 21 May 2009) (Impact factor 2008: 2.914)

Ágoston, R., Mohácsi-Farkas, Cs. and Pillai, S. D.: Exposure to sub-lethal temperatures induces enhanced heat resistance in *Listeria monocytogenes*. *Acta Alimentaria*, In press (accepted 25 May 2009) (Impact factor 2007: 0.398 )

### Nem IF-es folyóirat cikk (magyar)

Csóka M., Szabó S. A., Varga L., Ágoston R. és Mohácsiné Farkas Cs. (2007): Hosszú ideig tárolt, házi készítésű aszalványok vizsgálata. *Élelmiszervizsgálati közlemények, Élelmiszerminőség-Élelmiszerbiztonság*, LIII, 2, 79. old.; ISSN 0422-9576

Beczner J., Ágoston R., Cserhalmi Zs., Batáné Vidács I., Szekér K. (2008): *Alicyclobacillus acidoterrestris* II., A kezelések hatása a baktériumra. *Ásványvíz Üdítőital Gyümölcslé Alkoholmentes Italok* IX (3), 52-56. old.

Szabó S. A., Tolnay P., Mohácsiné Farkas Cs., Ágoston R. (2008): A CHIO-WOLF Magyarország Kft. burgonyachips termékeinek vizsgálata 7. rész. Csomagolás, jelölés és a mikrobiológiai jellemzők vizsgálata. *Élelmészeti ipar*, 62. évf., 9. sz., 273-275. old.

## Konferencia kiadványok

### Magyar nyelvű (abstract)

Ágoston R., Beczner J., Cserhalmi Zs. (2004): Egyedi és kombinált kezelések hatása *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórákra és vegetatív sejtekre. Keszthely, 2004. okt 7-9., A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és X. Fermentációs Kollokvium Előadás kivonatok, 2. old.

Ágoston R., Mohácsiné Farkas Cs., Kiskó G., Polyákné Fehér K. (2005): Lucernacsíra mikrobiológiai biztonságának növelése kombinált kezeléssel. Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, 2005. október 19-20., Élelmiszertudományi Kar, Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest, Összefoglalók, 138-139. old.; ISBN 963 503 342 7

Ágoston R., Mohácsiné Farkas Cs. (2006): Hőstressz hatása *Listeria monocytogenes* 4ab hőpusztulására. Debrecen, 2006 március 29-31., EOQ MNB XV. Élelmiszer Minőségellenőrzési Tudományos Konferencia Konferenciakiadvány, 178. old.; ISBN: 963 229 636 2

Ágoston R., Mohácsiné Farkas Cs. (2007): Hőstressz *Listeria monocytogenes* 4 ab-re gyakorolt hatásának vizsgálata táplevesben és tejben. Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, 2007. November 7-8., Élelmiszertudományi Kar, Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest Összefoglalók, 38-39. old.; ISBN 978 963 06 3350 5

Mohácsiné Farkas Cs., Farkas J., Ágoston R., Dalmadi I. (2008): DSC alkalmazása mikrobiológiai vizsgálatokban. EOQ MNB XVI. Élelmiszer minőségellenőrzési Tudományos Konferencia Kiadványa, Tihany 2008 ápr. 24-25., 289. old.

### Nemzetközi konferencia (Abstract)

Beczner, J., Cserhalmi, Zs., Ágoston, R., Vidács, I., Szekér, K. (2004): Effect of combined treatments on spores of *Bacillus cereus* and *Alicyclobacillus acidoterrestris*. CEFood Congress, Budapest, April 26-28., 2004, Programme and Book of abstracts, p. 241.

Ágoston, R., Mohácsi-Farkas, Cs., Kiskó, G., Dalmadi, I. (2005): Effects of combined treatments of MAP and irradiation on alfalfa sprouts. Abstracts of the 1st Central European Forum for Microbiology (CEFARM) and Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, October 26-28., 2005, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52, p. 2; ISSN 1217-8950

Ágoston, R., Mohácsi-Farkas, Cs., Dalmadi, I. (2006): Effect of high hydrostatic pressure (HHP) stress on the survival of *Listeria monocytogenes*. Keszthely, October 18-20., 2006, Abstracts of the Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 53, 3, p. 238.; ISSN 1217-8950

Ágoston, R., Mohácsi-Farkas, Cs. (2006): Stress adaptive response of *Listeria monocytogenes* 4ab after heat and HHP treatment. Food Micro 2006, The 20th International ICFMH Symposium, Bologna, Italy, August 29-Sept 2., 2006., Abstracts, p. 113.

Ágoston, R., Mohácsi-Farkas, Cs. (2007): Modelling the effect of heat stress on survival of *Listeria monocytogenes* 4ab in tryptic soy broth and milk. Abstracts of the 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, July 18-20., 2007, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 54 (Suppl), p. 1.; ISSN 1217-8950

Ágoston, R., Soni, K., McElhany, K., Cepeda, M. L., Zuckerman, U., Tzipori, S. and Pillai, S. D. (2007): Continuous flow centrifugation (CFC) technology for pre-analytical sample processing to separate and concentrate bio-threat agents from large volumes of milk. Branch of the American Society for Microbiology, Annual Fall Meeting, Huntsville, Texas, November 15-17., 2007, p. 23.

Balla, Cs., Friedrich, L., Zeke, I., Horváth, K., Farkas, Cs., Ágoston, R. (2008): Temperature monitoring of refrigerated display cabinets in supermarkets in time and space with thermocamera and RFID technology. Proceedings of Cold Chain-Management, 3rd International Workshop, Bonn, June 2-3., 2008, pp. 298-303.

Ágoston, R., Soni, K., Jesudhasan, P., Russell, B., Mohácsi-Farkas, Cs., Pillai, S. D. (2009): Proteomic analysis of the differential expression of proteins in *Listeria monocytogenes* during 48°C heat shock and 60°C temperature exposure. The 21st International ICFMH Symposium, "Evolving microbial food quality and safety", Aberdeen, Scotland, Programme and Abstract book, Sept 1-4., 2008, p. 153.

## **Könyv, könyvrészlet, jegyzet**

### **Angol nyelvű**

Mohácsi-Farkas, Cs., Farkas, J., Andrásy, É., Polyák-Fehér, K., Brückner, A., Kiskó, G., Ágoston, R. (2006): Improving the microbiological safety of some fresh pre-cut and pre-packaged chilled produce by low-dose gamma irradiation. In: Use of Irradiation to Ensure the Hygienic Quality of Fresh, Pre-Cut Fruits and Vegetables and Other Minimally Processed Food of Plant Origin; pp. 130-169., IAEA *TECDOC Series No. 1530*, ISBN 92-0-114006-1