



Élelmiszertudományi Kar

**HÚSROMLÁST OKOZÓ *PSEUDOMONAS* FAJOK MOLEKULÁRIS NYOMON KÖVETÉSE,
VALAMINT
A SZTAFILOKOKKUSZ ENTEROTOXIN GÉN EXPRESSZIÓJÁNAK ÉS TERMELÉSÉNEK
VIZSGÁLATA**

Márta Dóra

Doktori értekezés tézisei

Budapesti Corvinus Egyetem
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

Budapest, 2011

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

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

Témavezetők: Maráz Anna
Egyetemi tanár, CSs
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

Prof. Peter Rådström
University professor, PhD
Head of the Department of Applied Microbiology
Lund University, Faculty of Engineering (LTH), Svédország

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 témavezetők jóváhagyása



1. BEVEZETÉS

A vörös hús fogyasztása a gyűjtögetés és a vadászat kora óta az ember táplálkozásának fontos részét képezi. A húsfogyasztás gyakoribbá válásához az állatok (elsőként a bárány) háziasítása is hozzájárult, amely a neolitikus forradalom hajnalán bontakozott ki Kr. e. 8500-ban. A vörös hús különböző fehérjék, esszenciális aminosavak és nyomelemek forrása, amelyek nélkülözhetetlenek az egészséges emberi élet szempontjából.

Mindezek a tulajdonságok, illetve a hús magas vízaktivitása tökéletes közeget biztosítanak a mikrobák szaporodásához. Az állat levágását követően a hús a környezetből származó különböző pszichrotrof, pszichrofil és mezofil mikroorganizmusokkal szennyeződik. Aerob körülmények között hűtve tárolt hús felületén különböző *Pseudomonas* fajok szaporodnak el, amelyek jelentős szerepet játszanak a romlási folyamatokban. Metabolizmusukkal (beleértve a proteolitikus és lipolitikus aktivitásukat is) hozzájárulnak a romlás folyamatához, ezen belül a kellemetlen szaghoz és nyálkaképzéshez is. A *Pseudomonas* nemzetség jellemzése több nehézségbe is ütközik, mivel genetikailag meglehetősen heterogén fajokból tevődik össze. A nemzetségből származó egyes fajok átcsoportosítása a 16S rRNS-en alapuló munkáknak köszönhető. Mindezek ellenére fontos feltárni az egyes *Pseudomonas* fajok molekuláris szinten való sokféleségét, hogy a romlásban betöltött szerepüket még inkább megértsük. Jelen munkámban a 4 és 8°C-on aerob módon tárolt disznókarajról származó *Pseudomonas* fajok biodiverzitását tanulmányoztam különböző molekuláris módszerek alkalmazásával. Ezek a molekuláris módszerek a RAPD, ARDRA, *rpoB*-RFLP, a 16S rDNS és *rpoB* gének szekvenálását, illetve faj-specifikus PCR alkalmazását foglalták magukba. Szintén elvégeztem egy nemzetség-specifikus primer pár tesztelését is, illetve ezzel párhuzamosan eltérő forrásokból származó *Pseudomonas* fajokra kifejlesztett különböző táptalajok alkalmazhatóságát is vizsgáltam. Ezen túlmenően az egyes izolátumok proteolitikus és lipolitikus aktivitását is vizsgáltam különböző hőmérsékleteken fél-kvantitatív módszer segítségével.

A flavobaktériumok kezdetben szintén részét képezik a romlást okozó mikroba közösségnek. A húsról származó flavobaktériumok jellemzésére vonatkozóan kevés információval rendelkezünk, mivel a *Flavobacteriaceae* családon belül az 1990-es évek közepén helyreigazítások kezdődtek, melynek során a *Chryseobacterium* nemzetséget is létrehozták a család tagjaként. Csupán korlátozott információ áll rendelkezésünkre az egyes, romlások során izolált *Chryseobacterium* izolátumokkal kapcsolatban. Munkámban a hús romlása során izolált *Chryseobacterium* izolátum és típusörzse növekedését is jellemeztem folyadék tenyészetben, különböző hőmérsékleteken, illetve a *Chryseobacterium* izolátum kompetícióra való képességét szintén vizsgáltam egy *P. fragi* izolátummal szemben, különböző sejtarányokat alkalmazva közöttük.

Az élelmiszerbiztonság kérdése elengedhetetlen tényező az élelmiszeriparban. A fogyasztók egyre kevesebb tartósítószerrel tartalmazó, friss élelmiszerek iránti igénye folyamatos az év minden szakaszát tekintve. A friss élelmiszerek globális szintű szállítása, forgalmazása és fogyasztása szintén előtérbe helyezi az élelmiszerbiztonság fontosságát. Az élelmiszerek patogén mikroorganizmusokkal való szennyeződése egyre nagyobb gazdasági és szociális problémát jelent. Ezzel együtt az élelmiszer eredetű megbetegedések palettája is folyamatosan változik. Közben új patogének bukkannak fel, a már létező patogén mikroorganizmusok újabb tulajdonságokkal vértezik fel magukat és eddig nem feltételezett élelmiszer-mátrixokban is megjelennek. A legutolsó élelmiszer eredetű botrány, amely felhívta a fogyasztók figyelmét az élelmiszerbiztonság fontosságára, illetve a megelőzésre, 2011. májusában robbant ki Németországban, amelyet egy további botrány követett júniusban Franciaországban. Mindezekért a Shiga toxin 2a-t termelő *E. coli* O104:H4 szerotípusa volt felelős.

A *Staphylococcus aureus* egyike azon leggyakoribb patogéneknek, amelyek élelmiszer eredetű járványokat képesek okozni. A *S. aureus* felelős a sztafilokokkusz hőstabil toxin által előidézett ételmérgezésekért. 2008-ban az EU-n belül az ételmérgezések 4. leggyakoribb okozójának számított. Maga a baktérium sejt ugyan hőkezeléssel előlhető az élelmiszerben, azonban az általa termelt toxin még tartós hőkezelés hatására is stabil marad. A baktériummal való szennyeződés főképp a főtt, illetve a már feldolgozott, fehérjében gazdag élelmiszerek helytelen és hosszan tartó manuális módon történő kezelése során történik, amely ezt követően a nem megfelelő hőkezeléssel és/vagy tárolási hőmérséklettel is párosul. Jelenleg 22 sztafilokokkusz enterotoxin (SE), vagy enterotoxin-szerű fehérje ismeretes. A két leggyakoribb enterotoxin azonban, amelyekről leggyakrabban beszámolnak az ételmérgezések kapcsán, mégis a SEA és SED toxinok, amelyeket genetikailag eltérő hordozók kódolnak. A SEA (sztafilokokkusz enterotoxin A) fehérjét a *sea* gén kódolja, amely egy profágon található, a gén kifejeződése pedig a profág életciklusához kötött a baktériumon belül. A SED (sztafilokokkusz enterotoxin D) a plazmidon hordozott *sed* gén által kódolt fehérje, és e gén szabályozását az úgynevezett "kiegészítő szabályozó rendszer" (Agr rendszer) végzi a Rot (toxin represszió) aktivitásának csökkentésével az RNS III-on keresztül. A folyadék tenyészetben elszaporított baktérium tenyészetek viselkedése és toxin génjeik expressziója nagymértékben eltérhet azon baktériumokétól, amelyek élelmiszer-mátrixban találhatóak, mivel az élelmiszerben a *S. aureus* sejtek más baktériumokkal is kapcsolatban állhatnak, s köztük esetleg teljesen más molekuláris szintű jeladás megy végbe. A SEA és SED fehérjék képzésére és *sea* és *sed* génekre vonatkozóan génexpressziós vizsgálatokat végeztem négy különböző feldolgozott sertéshúst tartalmazó élelmiszeren abból a célból, hogy még inkább megismerjem ezen körülmények hatását. Kontroll kísérletként a *Staphylococcus aureus* SA 45 törzs tenyésztését végeztem optimális növekedési feltételek mellett pH szabályozott fermentációkban. A *sea* és *sed*

gének relatív expresszióját kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció segítségével (qRT-PCR), míg az extracelluláris SEA és SED termelését enzimjelzéses immunanalitikai módszer (ELISA) segítségével határoztam meg.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám legfőbb célkitűzése a hús romlása során dominánssá váló baktériumok (különösképpen a *Pseudomonas* fajok) tanulmányozása, illetve az ételmérgezést okozó *S. aureus* enterotoxin termelésének vizsgálata volt. A *Pseudomonas* fajok esetében a fő célok a következők voltak: (i) módszertan kidolgozása molekuláris tipizálás és identifikálás céljából (ii) a disznóhúsról származó romlást okozó mikrobióta biodiverzitásának meghatározása és jellemezése hagyományos és molekuláris módszerek segítségével.

A *Staphylococcus aureus* vizsgálatokat tekintve a következő célokat tűztem ki, melyek közé tartozott (i) az enterotoxin gének relatív expressziójának vizsgálata, (ii) az enterotoxin termelés meghatározása, illetve (iii) egy *S. aureus* törzs enterotoxin termelésének összehasonlító vizsgálata élelmiszerben és fermentóban molekuláris és immunológiai módszerek segítségével.

A megvalósítandó célok eléréséhez az alábbi fő lépéseket határoztam meg:

1. *Pseudomonas* szelektív táptalajok értékelése az egyes pszeudomonászok detektálására
2. *Pseudomonas* spp. genetikai diverzitásának molekuláris meghatározása és értékelése különböző PCR-alapú módszerek alkalmazásával
 - a) Purohit és munkatársai (2003) által publikált *Pseudomonas* nemzetség-specifikus primer pár értékelése
 - b) molekuláris tipizálás és az izolátumok összehasonlítása RAPD segítségével
 - c) *Pseudomonas* izolátumok identifikálása faj-specifikus PCR primerek segítségével
 - d) 16S rDNS és *rpoB* gének analízise PCR-RFLP és DNS szekvenálás segítségével
3. Az izolátumok proteolitikus és lipolitikus aktivitásának meghatározása a romlásban betöltött potenciáljukra vonatkozóan
4. *Chryseobacterium antarcticum* izolátum romlásban betöltött szerepének és versenyképességének vizsgálata
5. *S. aureus* SA 45 növekedésének vizsgálata
 - a) különböző hústermékeken
 - b) pH szabályzott fermentációkban.
 - c) illetve, a *S. aureus* enterotoxint kódoló *sea* és *sed* génjei kifejeződésének vizsgálata kvantitatív RT-PCR-rel (az 5.a.-b. pontban szereplő körülményekre vonatkozóan)
 - d) és az extracellulárisan termelt SEA és SED toxinok meghatározása ELISA segítségével (az 5.a-b pontban szereplő körülményekre vonatkozóan)

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A munkám során vizsgált *Pseudomonas* törzsek hűtött, aerob módon tárolt disznókarajról származtak, melyek a romlás 8. napján 4°C-ról, illetve a tárolás kezdetéről, majd pedig a romlás 6. napján lettek izolálva 8°C-ról a budapesti Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Mikrobiológiai Osztályán,. Munkámba további típus és referencia törzseket is bevontam, melyek különböző törzsgyűjteményekből származtak.

A szelektív és elektív táptalajok értékelése során a különböző *Pseudomonas* fajok esetében Cetrimid, GSP, *Pseudomonas* Agar F és P táptalajokat alkalmaztam, s egyben vizsgáltam a táptalajokon való fluoreszkáló képességet és pigment termelést is 20, illetve 30°C-on. Kontroll táptalajként az összes sejtszám meghatározására szolgáló PCA lemezeket használtam. A *Pseudomonas* izolátumok előzetes szűrésének elvégzéséhez, amely segítséget nyújthat a további élelmiszerekhez kapcsolódó vizsgálatokhoz egy, az irodalomban talált Purohit et al. (2003) által publikált nemzetség-specifikus primer párt teszteltem *Pseudomonas* izolátumokkal és típus-törzsekkel, illetve nem *Pseudomonas* törzsekkel. A *Pseudomonas* izolátumok tipizálására RAPD-PCR-t alkalmaztam, melynek során különböző szekvenciákkal rendelkező random primereket használtam. A *Pseudomonas* izolátumok identifikálása során az alábbi módszereket alkalmaztam: ARDRA, *Pseudomonas fragi* és *P. lundensis* faj-specifikus primer párok, illetve a 16S rDNS és *rpoB* gének szekvenálása, valamint az *rpoB*-RFLP analízis. A 16S rDNS-RFLP és az *rpoB*-RFLP analízis során négy restriktív enzimet alkalmaztam az ampikonok hasítására. A RAPD mintázatok, illetve a 16S rDNS-RFLP és *rpoB*-RFLP mintázatok alapján dendogramokat készítettem a GelComparII szoftver segítségével, amelyeket ezt követően kiértékeltem. A 16S rDNS és *rpoB* szekvencia analízis során a szekvenciákat a nyilvánosan hozzáférhető NCBI GenBank szekvencia adatbázisához illesztettem, hogy az izolátumokat meghatározzam. Az izolátumok proteolitikus és lipolitikus aktivitásának vizsgálatára félkvantitatív módszert alkalmaztam, melynek során megmértem a telepek körüli a feltisztulási zónákat, illetve az opálos gyűrűket a sovány tejporos (SM), nátrium-kazeinátos agaron (SMC), illetve Tween 80-at (PAT-80) és tributirint tartalmazó agar (PCATB) lemezeken. A lemezek inkubálását minden esetben 15, 20, 25, illetve 30°C-on is elvégeztem, a feltisztulási zónák képződését 24, 72 illetve 168 óra után ellenőriztem.

Egy, a *Pseudomonas* izolátumok közé nem besorolható izolátum jellemzését is elvégeztem, miután a 16S rDNS szekvenciáját az EzTaxon server 2.1 adatbázisához is illesztettem és *Chryseobacterium antarcticum*-ként identifikáltam. A *Chryseobacterium antarcticum* F1445/3 izolátum tenyésztését és jellemzését különböző hőmérsékleteken végeztem el (5°C-tól 30°C-ig terjedően) a *Chryseobacterium antarcticum* JCM 12381^T típus-törzsszel párhuzamosan. A törzsek proteolitikus és

lipolitikus aktivitás vizsgálatát is megvalósítottam. Ezen *Chryseobacterium antarcticum* F1445/3 izolátum kompetícióra való képességét szintén vizsgáltam egy *P. fragi* F1445/1b izolátummal egyetemben, amelynek során különböző kiinduló sejtkoncentráció arányokat állítottam be a folyadéktenyészetekben.

A *Staphylococcus aureus* enterotoxin vizsgálatokban egy ételmérgezés során izolált, főtt sonkáról származó SA 45 elnevezésű törzset használtam, amellyel négy feldolgozott hústerméken (füstölt, főtt sonkán, Serrano sonkán és fekete borsos szalámin) végeztem el a vizsgálatokat a törzs növekedésére, a *sea* és *sed* gének expressziójára, illetve a SEA és SED enterotoxin termelésre vonatkozóan. A génkifejeződés vizsgálatát kvantitatív reverz transzkripció PCR segítségével valósítottam meg hibridizációs próbák alkalmazásával. A *Staphylococcus* által termelt enterotoxin A és D mennyiségi meghatározását külön reakcióban végeztem szendvics ELISA segítségével, amelyben poliklonális ellenanyagokat alkalmaztam. pH szabályozott fermentációkat is végeztem pH 7-es beállítással ugyanezen törzssel, amelynél a fentebb említett vizsgálatokat szintén elvégeztem, illetve nyomon követtem.

4. EREDMÉNYEK

4.1. *Pseudomonas* izolátumok jellemzése

A 4 és 8°C-on tárolt húsról izolált reprezentatív baktérium törzsek morfológiai, fiziológiai, illetve biokémiai tulajdonságainak meghatározásával kezdtem a munkát. Összesen 34 pszichrofil/pszichrotróf baktérium izolátumot jellemeztem, melyek közül mindegyik Gram negatív, kataláz és oxidáz pozitív volt. A vizsgált izolátumok egyike sem volt spóraképző. Különböző *Pseudomonas* táptalajok szelektivitását is vizsgáltam az izolátumok növekedését és fluoreszkálási képességét illetően 20°C, és 30°C-on 72h-n át. Az izolátumok mindegyike nőtt mindkét inkubálási hőmérsékleten kivéve az F1445/3 izolátumot, amely gyenge növekedést mutatott 30°C-on. A nem *Pseudomonas* izolátumok gyenge növekedést mutattak mindkét hőmérsékleten. Bár a *Pseudomonas* izolátumok mindegyike egységesen növekedett a táptalajokon, mégis eltérést tapasztaltam 20 és 30°C-on a fluoreszkáló képességükben, illetve a pigment termelésben. Öt izolátum (név szerint F1443/4c, F1443/5, F1443/6, F1443/7, F1443/11) rendelkezett zöldes-sárga színnel a Cetrimid és *Pseudomonas* Agar F táptalajokon. Ezek a táptalajokon, illetve a GSP agaron sokkal intenzívebben fluoreszkáltak ezek az izolátumok UV fény alatt 366nm-en, mint a többi izolátum. Az izolátumok többsége viszont nem fluoreszkált 20 és 30°C-on, sem a *Pseudomonas* Agar P lemezen, sem pedig PCA lemezen. Az izolátumok majdnem egy harmada szintén nem fluoreszkált a GSP, Cetrimid és *Pseudomonas* Agar F lemezekon. Négy izolátum esetében (név szerint F1443/12b, F1443/13a és b, F1445/4) sötétbarna pigment képződést tapasztaltam a *Pseudomonas*

Agar F lemezekon, míg ugyanezen színváltozást BHI lemezekon is megfigyeltem 3 napos 20 és 30°C-on való inkubálást követően. A vizsgálat során felhasznált összes szelektív és elektív táptalaj alkalmas volt a húsról izolált *Pseudomonas* törzsek tenyésztéséhez, illetve más, nem *Pseudomonas* törzsektől való megkülönböztetésére 30°C-on, illetve a fluoreszkáló képesség és pigment termelés detektálására. Az adatok alapján megállapítható, hogy az izolátumok többsége fluoreszkáló színanyagot, pioverdint termelt, amely a fluoreszkáló pszeudomonászokban feltételes sziderofórként szerepel. Munkám során azt tapasztaltam, hogy a pioverin vegyület 30°C-on kevésbé volt stabil, mint 20°C-on.

4.2. *Pseudomonas* izolátumok molekuláris jellemzése

Az élelmiszer romlást okozó *Pseudomonas* törzsek szűrésének tesztelésére egy nemzetség-specifikus primer párt alkalmaztam, amelyet az irodalomban Purohit és munkatársai publikáltak 2003-ban. Összesen 14 *Pseudomonas* típus és referencia törzzsel kaptam pozitív reakciót az általuk tervezett Psf-Psr primer párral, míg két *Pseudomonas* referencia törzs negatív, illetve 6 nem *Pseudomonas* törzs pozitív eredményt adott a reakció során. A módszer érzékenyégét kiszámolva 87,5%-ot kaptam, míg a specifikusság csupán 66,6% volt. A vizsgálatot már identifikált *Pseudomonas* izolátumok bevonásával is elvégeztem, ahol az érzékenység tovább csökkent 82,5%-ra. A kapott alacsony specifikussági érték alapján a primer pár további alkalmazhatóságát elvettem.

A hús romlásából származó *Pseudomonas* izolátumok molekuláris ujjlenyomatát is vizsgáltam RAPD-PCR segítségével az izolátumok diverzitásának jellemzése végett. A dendogram meglehetősen eltérő képet mutatott. A dendogramon belül az egyes izolátumok elkülönültek és csupán 60-70%-os hasonlóságot mutattak még abban az esetben is, ha egy ugyanazon hús mintáról vagy pedig más hús mintáról származtak. A *Pseudomonas* típus és referencia törzsek meglehetősen alacsony hasonlósági fokot mutattak és megállapítható, hogy általában 50% alatti, egyedülálló csoportokat alkottak.

A 16S rDNS-RFLP csoportanalízise alapján összesen 4 csoportot tudtam megkülönböztetni 60%-os hasonlósági szinten. Minden típus és referencia törzs, amelyek a *P. fragi*, *P. lundensis* és *P. fluorescens* fajokat érintette, az első két csoportba kerültek besorolásra. Csupán a *P. putida* ATCC 12633^T volt az egyetlen, amely a 4. csoportot részét képezte, azonban kevesebb, mint 70%-os hasonlósági szintet mutatva.

Szintén az irodalomban talált, Ercolini és munkatársai (2007) által a *carA* génre kifejlesztett multiplex PCR-t alkalmaztam a *Pseudomonas* izolátumaim közül a *P. fragi* és *P. lundensis* fajok identifikálására. A multiplex PCR-t optimalizáltam, azonban az egyes faj-specifikus primereket külön PCR reakcióban alkalmaztam. A 34 izolátum közül összesen 25 izolátumot identifikáltam *P.*

fragi-ként. Az izolátumok közül viszont egy sem volt *P. lundensis*. 9 izolátum esetében, amelyek a faj-specifikus PCR reakciókban negatív eredményt adtak, szekvenálást végeztem a 16S rDNS és *rpoB* gének alapján. További 8 izolátum esetében, amelyek bár pozitív reakciót adtak a *P. fragi* specifikus primer párral, de extra amplikonok is keletkeztek a reakcióban, szintén meg lettek szekvenálva. Az *rpoB* és 16S rDNS szekvencia analízis alapján viszont igazolást nyert, hogy ez a 8 izolátum *P. fragi*. A további 9 izolátum közül a szekvenálás eredményeként 8 *P. fluorescens* törzset határoztam meg. Egy izolátumot viszont, név szerint az F1445/3-at (amely előzetesen fenotípusos jellemzőkben is eltérést mutatott a többi *Pseudomonas* izolátumoktól mint pl. narancssárga pigment termelés, lassú növekedés) az EzTaxon server 2.1. adatbázisához illesztettem és *Chryseobacterium antarcticum*-ként identifikáltam.

Ezzel egy időben *rpoB*-RFLP analízist is végeztem, amely a molekuláris identifikálás szempontjából költséghatékonyabb módszernek számít. Az analízis során összesen 5 csoport különült el, amelyekben a hasonlósági százalék a 60%-ot meghaladta és az összes törzs csoportokba rendeződött a dendogramon belül. Az összes *P. fluorescens* és *P. fragi* típus és referencia törzs szintén egy nagy csoportba került besorolásra hasonlóképpen, ahogy ezt a 16S rDNS-RFLP analízisnél is tapasztaltam.

4.3. *Pseudomonas* izolátumok proteolitikus és lipolitikus aktivitása

A *P. fluorescens* izolátumok proteolitikus aktivitása a SM és SMC agar lemezeken 12, 20, 25, 30°C-on sokkal intenzívebb volt, mint majdnem az összes *P. fragi* izolátum esetében. Ezen belül is az SM lemezeken volt nagyobb a törzsek proteolitikus aktivitása az SMC lemezhez viszonyítva. A *P. fluorescens* izolátumok szintén nagyobb észteráz aktivitással rendelkeztek, mint a *P. fragi* izolátumok. Azonban a *P. fragi* izolátumoknak 15 és 20°C-on nagyobb lipáz aktivitásuk volt.

4.4. *Chryseobacterium antarcticum* és a romlásban betöltött szerepe

A *Chryseobacterium antarcticum* F1445/3 izolátum a 8°C-on tárolt hús kezdeti mikroba populációjából származott. Az izolátum növekedése szempontjából az optimális hőmérsékleti tartományt 15 és 25°C között állapítottam meg. A proteolitikus aktivitását tekintve pedig nagyobb aktivitással rendelkezett 15, 20, 25, 30°C-on, mint a *Chryseobacterium antarcticum* JCM 12381^T. Ennek oka abból eredhet, hogy az izolátum húsról származik, vagyis az adaptációja a húshoz kötött, míg a típus törzs az antarktisi élőhelyről származik. Mindkét törzs lipáz aktivitással is rendelkezett. A *P. fragi* F1445/1b és *Chryseobacterium antarcticum* F1445/3 izolátumok folyadék tenyészetben, eltérő sejtarányokkal történő kompetícióját tekintve, ha a két izolátum között a sejtarány

megegyezett, vagy pedig a *P. fragi* F1445/1b nagyobb arányban volt jelen, mint a *C. antarcticum* F1445/3, akkor a *P. fragi* túlnőtte a *C. antarcticum* F1445/3 izolátumot. Abban az esetben viszont, mikor a *Chryseobacterium antarcticum* F1445/3 rendelkezett nagyobb sejtkoncentrációval a folyadéktenyészetben, akkor a két izolátum között a kompetíció létrejött. Ennek oka lehet a *C. antarcticum* F1445/3 környezethez való jobb adaptációja.

4.5. *S. aureus* sea és sed génjeinek expressziója és toxin termelése

A *S. aureus*-sal végzett munkám során vizsgáltam az SA 45-ös törzs növekedését, hőstabil enterotoxin A és D termelését, illetve a különböző genetikai hordozókon elhelyezkedő *sea* és *sed* gének kifejeződését, melyek a toxin fehérjéket kódolják négy különböző beltartalmi tulajdonsággal rendelkező feldolgozott disznóhúsos élelmiszeren. Ezen gének expresszióját, illetve SEA és SED toxinok termelését folyadék tenyészetekben szintén vizsgáltam. Az Agr-rendszer által szabályozott *sed* gén expressziója hasonló volt a fág-által szabályozott *sea* kifejeződéséhez a disznóhús termékeken.

A *sea* expresszió az exponenciális és stacioner fázis közötti átmeneti szakaszban érte el az expresszió tetőpontját mind a hústermékek, mind pedig a folyadéktenyészetek esetében, ezáltal mutatva, hogy a génexpresszió a baktérium növekedéséhez kötődik, bár az időintervallum jelentősen eltérő volt a két mátrix között. A folyadéktenyészetben a *sea* gén expressziója a növekedés 3.-4. órájában volt a legmagasabb, míg a főtt és füstölt sonka esetében ez a tendencia az inkubálás 1.-2. napján következett be. A termelt SEA és SED toxinok mennyisége sokkal magasabb volt a főtt és füstölt sonka szeleteken már az első napot követően is. A füstölt sonka sokkal kevesebb mennyiségű SED/TKE *S. aureus* számmal rendelkezett, mint a főtt sonka. A Serrano sonkán a *S. aureus* növekedése korlátozott volt, illetve a SED mennyiség sem volt detektálható az inkubálás 5. napjáig. A SEA és SED toxinok detektált mennyisége azonban elegendőnek bizonyult egy esetleges sztafilokokkusz által okozott ételmérgezés kiváltására az arra érzékeny egyéneknél. A termelt SEA és SED toxinok közötti mennyiségi különbségek háttérében többek közt az állhat, hogy a SEA és SED fehérjéket kódoló *sea* és *sed* gének a *S. aureus*-on belül eltérő szabályozási rendszer alá tartoznak. A *S. aureus* növekedését mindhárom sonka termék elősegítette, míg a fekete borsos szalámin növekedés nem volt, amelyhez a tejsavbaktériumok jelenléte, az alacsony pH és a fűszerek is hozzájárulhattak.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Szelektív és elektív táptalajok értékelése *Pseudomonas* izolátumok esetén:

Bebizonyítottam, hogy a *Pseudomonas* Agar F, *Pseudomonas* Agar P, GSP agar és Cetrimid agarok kombinációja alkalmas a hús romlásából származó *Pseudomonas* fajok detektálására és jellemzésére 30°C-on történő inkubálás esetén, míg a *Chryseobacterium antarcticum* szintén képes ezeken a tápközegeken növekedni 20°C-on. Az izolátumok fluoreszkáló képessége 30°C-on kevésbé volt intenzív ugyanazon időpontban vizsgálva, mint a 20°C-on inkubált lemezek esetében. Ez az eltérés a 30°C-on történő intenzívebb növekedés következménye lehet, illetve a fluoreszkálásért többek közt felelős pioverdin instabilitásáért is, melynek lebomlása a tenyészet stacioner növekedési fázisba való belépéséhez köthető.

2. *Pseudomonas* izolátumok molekuláris identifikálása és tipizálása

Az irodalomban közölt Purohit et al. (2003) által kifejlesztett nemzetség-specifikus primer pár segítségével csupán 66,6% specifikusságot és 82,5% szenzitivitást értem el, miután a *Pseudomonas* izolátumokkal, referencia és típusörzsekkel is elvégeztem a vizsgálatokat. Ennek alapján ez a primer pár nem alkalmas a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó fajok előzetes szűrésére.

Megállapítottam, hogy a RAPD analízis nem felelt meg a *Pseudomonas* izolátumok nagy hasonlósági csoportjainak létrehozására a nagyfokú molekuláris diverzitásuknak köszönhetően. Azonban a módszer alkalmazható ezen izolátumok tipizálására. A 16S rDNS-RFLP módszer sem tipizálásra, sem pedig identifikálásra nem volt alkalmas, illetve az *rpoB*-RFLP, szintén nem alkalmas identifikálási célokra.

A 16S rDNS és *rpoB* gének szekvenálásával, illetve faj-specifikus primer párok segítségével meghatároztam, hogy a 4°C-on tárolt disznóhús romlásának végén *P. fluorescens* és *P. fragi* fajok dominálnak, a 8°C-on tárolt hús tárolásának kezdetén a kezdeti mikrobiótát pedig nemcsak ezek a fajok, hanem a *Chryseobacterium antarcticum* (F1445/3) is alkotta. A 8°C-os tárolás végén csak a *P. fragi* fajhoz tartozó törzsek voltak izolálhatók.

3. *Pseudomonas* izolátumok proteolitikus és lipolitikus aktivitása:

A *Pseudomonas fluorescens* izolátumok meglehetősen intenzív proteolitikus aktivitást mutattak az SMC lemezekben 15, 20, 25, és 30°C-on való inkubálásuk során, kivéve a F1443/2a és F1443/7 izolátumokat, melyek proteolitikus aktivitását csak 15 és 20°C-on tudtam detektálni. Ezen belül is a proteolitikus aktivitás az SM lemezekben volt nagyobb az SMC lemezekhez viszonyítva. A *P. fluorescens* izolátumok szintén intenzívebb és nagyobb észteráz aktivitással rendelkeztek, mint a *P. fragi* izolátumok az összes inkubálási hőmérsékleten. Azonban a *P. fluorescens* izolátumok 15 és

20°C-on kisebb lipáz aktivitással rendelkeztek, mint a *P. fragi* fajok. A *P. fragi* izolátumok többsége rendelkezett proteolitikus és lipolitikus aktivitással.

4. A *Chryseobacterium antarcticum* romlási potenciálja:

Első alkalommal identifikáltam a *Chryseobacterium antarcticum* baktériumot disznóhús felületéről. A *Chryseobacterium antarcticum* F1445/3 jellemzését tekintve az optimális növekedési hőmérsékletet 15 és 25°C között állapítottam meg. Az új izolátumnak 15, 20, 25 és még 30°C-on is volt proteolitikus aktivitása. Az izolátum lipáz aktivitással is rendelkezett ugyanúgy, ahogy a típusörzs is, viszont észteráz aktivitásuk nem volt. Ezen izolátum proteolitikus és lipolitikus aktivitásának köszönhetően szintén hozzájárul a romlás kezdeti folyamatához. A *Chryseobacterium antarcticum* F1445/3 és *P. fragi* F1445/1b izolátumok közötti kompetíció vizsgálata során megállapítottam, hogy abban az esetben, mikor a *Chryseobacterium antarcticum* nagyobb sejtkoncentrációban volt jelen, mint a *P. fragi* F1445/1b izolátum, akkor a *C. antarcticum* képes volt nemcsak nőni, hanem a *P. fragi*-val való kompetícióra is, miután ez utóbbi elérte a növekedési maximumát, majd a növekedése hanyatlásnak indult. Abban az esetben viszont, mikor ez a két izolátum egyenlő sejtkoncentrációban, vagy pedig a *P. fragi* nagyobb arányban volt jelen a tenyésztés elején, ez a kompetíció nem jött létre.

5. *Staphylococcus aureus* növekedésének illetve enterotoxin expressziójának és termelésének egyidejű vizsgálata:

Első alkalommal vizsgáltam a *S. aureus* *sea* and *sed* enterotoxin génjeinek expresszióját az enterotoxinok termelésével egyetemben élelmiszerekben úgy, mint főtt, füstölt, Serrano sonkán és fekete borsos szalámin. Folyamatos és kiterjedt *sea* és *sed* gén expressziót figyeltem meg a sonka termékeken, illetve a fermentációk során is, azonban ezen gének kifejeződése és enterotoxin képzése eltért. A *sea* gén expressziója folyamatos volt pH szabályozott körülmények során, míg a *sed* expressziója a 4. nap után egy második expressziós csúcst is elért. A megtermelt SEA toxin mennyisége nagyobb volt, mint a SED mennyisége a fermentáció alatt, viszont itt mindkét toxin stabil maradt a folyadéktenyészetben. A megtermelt SEA és SED arányában és mennyiségében szintén eltérést tapasztaltam a sonka termékek esetében, viszont a mennyiségek elegendőek lehetnének egy esetleges sztafilokokkusz által okozott ételmérgezés kiváltásához. A füstölt sonkán a toxinok mennyisége stabil maradt, míg a főtt sonkán az 5. nap után csökkenést detektáltam. A fekete borsos szalámin sem növekedés, sem pedig enterotoxin termelést nem tudtam kimutatni.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A szelektív és elektív (név szerint Cetrimid, GSP, *Pseudomonas* agar F és P) tápközegeken történő tenyésztés eredményeit figyelembe véve mindegyik táptalaj alkalmasnak bizonyult a húsról származó *Pseudomonas* izolátumok szelekciójára és előzetes jellemzésére, azonban inkubálási hőmérsékletnek 30°C-ot javasolom a 20°C helyett. Ahhoz, hogy a húsról származó *Pseudomonas* izolátumok pigment termeléséről szélesebb képet kapjunk, a *Pseudomonas* Agar F és P táptalajok is alkalmazhatóak. A pigment termelés és a romlást okozó pszeudomonászok életciklusában betöltött szerepének vizsgálata pedig szintén hozzájárulhat a továbbiakban ezen baktériumok meghatározásához és megismeréséhez, amelyet a 2000-es évek elején folyó kutatások eredményei is alátámasztanak (Meyer, 2000). A pioverdin, amely egy fluoreszkáló pigment, egy esetleges és könnyen kezelhető taxonómiai marker lehet a *Pseudomonas* nemzetség fluoreszkáló fajainak meghatározásában (Meyer, 2000). Egy másik kutatásban pedig rámutattak arra, hogy ezek a különböző pigmentek a baktériumon belül a génexpresszió kontrollállása során szignál molekulákként töltenek be szerepet (Lamont and Martin, 2003), míg a *P. aeruginosa* esetében megállapították, hogy a piocianin termelésnek potenciális virulencia funkciója van (Liu and Nizet, 2009).

Megállapítottam, hogy a RAPD analízis nagyszámú izolátum elő-szelekciójára alkalmas, a szekvenálás pedig a leginkább megfelelő identifikálási módszer, mivel sokkal pontosabb meghatározást tesz lehetővé azáltal, hogy a DNS-en belül nukleotidok sorrendjét vizsgálja, míg a PCR-RFLP módszer csupán néhány restrikciós hasítási helyre összpontosít. Mindazonáltal egy laboratóriumon belüli saját PCR-RFLP adatbank létrehozása ezidáig költséghatékonyabb és olcsóbb módszernek bizonyult. Szintén ígéretes módszernek tűnik az MLST (multi-lókuszos szekvencia tipizálás) technika. Ez a módszer sokkal megbízhatóbb a *Pseudomonas* fajok detektálására a jövőt tekintve, amely a *rpoB*, *gyrB* vagy *rpoD* gének egyidejű kombinálására és alkalmazására épít. Alternatív megoldásként szintén szóba jöhet a Rep-PCR (repetitív extragenikus palindrom-PCR). A módszer a kromozómán belüli repetitív elemekre fókuszál, amelyek random módon helyezkednek el a baktérium genomján belül, s ezáltal válnak a PCR amplifikáció során célszekvenciává. További faj-specifikus primer párok tervezése pl. a *P. fluorescens* fajra nézve szintén egy lehetőség lehet a kutatásokban, melynek során a megtervezett primer párok az anyagcsere folyamatokban szerepet játszó pl. az enzim vagy pigment termelésért felelős génekre lennének specifikusak. A *P. fluorescens* faj esetében viszont ennek a lehetőségnek a megvalósítása több nehézséget is hordoz, mivel a *P. fluorescens* fajnak a változatos ribotipizálási mintázata alapján 5 biotípust különböztették meg. A fiziológiai, illetve a lipolitikus és proteolitikus tulajdonságait tekintve a *Chryseobacterium antarcticum* szintén részét képezheti a romlást okozó mikrobiótának, azonban

szerpe csupán a romlás legelején van. További új kutatási területet jelenthet ezen fiatal *Chryseobacterium* nemzetségbe tartozó fajok molekuláris jellemzése az identifikálásuk szempontjából. Néhány információ ugyan rendelkezésre áll a molekuláris adatbázisban a *gyrB* génről, amely a DNS giráz enzim B protein alegységét kódolja, de ez csak néhány *Chryseobacterium* faj esetében mondható el.

A sonka termékeken tapasztalt kiterjedt és folyamatos *sea* és *sed* expresszió új információ nyújtott a SEA és SED fehérjék termeléséről az élelmiszerekben, amelynek során a sejtek immobilizált állapotban növekedtek egy nagy, összetett mikroba közösségben. Ezen túl a *sed* gén génexpressziós mintázata a *sed* gén expresszióját szabályozó hálózatának komplex működését tükrözi. Ezek az eredmények talán hozzájárulhatnak ahhoz, hogy növeljük a sztafilokokkusz által okozott ételmérgezésének megbecslését. Azonban további adatok is szükségesek lennének a sztafilokokkusz által termelt enterotoxinok szabályozására és jelátadására vonatkozóan, hogy biztosítani tudjuk a mikrobiológiailag biztonságos élelmiszerek előállítását, amely kiváló minőséggel rendelkezik. Emiatt további kutatásokat kell végezni a tekintetben, hogy a különböző külső és belső tényezők, hogyan befolyásolják a génexpressziót, majd a toxintermelést a *S. aureus*-on belül, s egyben a *S. aureus* növekedést is különböző élelmiszermátrixokban. Az úgynevezett ‘microarray’ vizsgálaton alapuló kutatások segíthetnének abban, hogy megértsük a globális génszabályozás mechanizmusát ezek között a toxinok között, illetve hogyan is befolyásolja a “quorum sensing” a toxintermelést ezekben a termékekben akkor, ha más mikroba közösségek is részt vesznek az élelmiszer romlási folyamatában.

Hivatkozások:

Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F. (2007) Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 2354-2359.

Lamont, I.J., Martin, L.W. (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**: 833-842.

Liu, G.Y., Nizet, V. (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology* **17**: 406-13.

Meyer, J.M. (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* **174**: 135-142.

Purohit, H.J., Raje, D.V., Kapley, A. (2003) Identification of signature and primers specific to genus *Pseudomonas* using mismatched patterns of 16S rDNA sequences. *BMC Bioinformatics* **4**: 19.

7. PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

FOLYÓIRATCIKKEK

IF-es folyóirat cikk

1. Belák, Á., Kovács, M., Hermann, Zs., Holczman Á.N., **Márta, D.**, Cenič Stojakovič, S., Bajcsi, N., Maráz, A. (2011) Molecular analysis of poultry meat spoiling microbiota and heterogeneity of their proteolytic and lipolytic enzyme activities. *Acta Alimentaria* **40** (Supplement): 3-22. (Impakt faktor: 0.379)
2. **Márta, D.**¹, Wallin-Carlquist, N.¹, Schelin, S., Borch, E., Rådström, P. (2011) Extended staphylococcal enterotoxin D expression in ham products. *Food Microbiology* **28**: 617-620. ¹ **A szerzők egyenlő arányban vettek részt a cikk létrehozásában.** (Impakt faktor: 3.320)
3. Wallin-Carlquist, N. ¹, **Márta, D.** ¹, Borch, E., Rådström, P. (2010) Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. *International Journal of Food Microbiology* **141**: S69–S74. ¹ **A szerzők egyenlő arányban vettek részt a cikk létrehozásában.** (Impakt faktor: 3.143)
4. Wallin-Carlquist, N., Cao, R., **Márta, D.**, Sant'Ana da Silva, A., Schelin, J., Rådström, P. (2010) Acetic acid increases the phage-encoded enterotoxin A expression in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology* **10**: 147. (Impakt faktor: 2.96)
5. Takács, K., Némedi, E., Gelencsér, E., Kovács, E. T., **Márta, D.** (2007) Use of the enzyme transglutaminase for developing gluten-free noodle products with high quality from pea flour. *Acta Alimentaria* **36** (2):195-205. (Impakt faktor: 0.379)

Nem IF-es folyóirat cikk (magyar)

1. **Márta, D.** (2007) Immunanalytical methods for the detection of gliadin as wheat allergen protein, *Journal of Food Investigations Food Quality-Food Safety Volume LIII*. pp. 166-173.
2. **Márta, D.** (2006) Immune analytical detection of gliadin in food products. *Hungarian Food Industry, Vol. LX. Number 2006. 6-7*. pp. 185-187.

KONFERENCIA KIADVÁNYOK

Magyar nyelvű (abstract)

1. Belák, Á., **Márta, D.**, Krascsenics, K., Cenič, S., Maráz, A. (2008) Physiological characterisation and molecular typing of poultry meat spoiling bacteria, 11st Colloquium of Fermentation and the Plenary Congress of the Hungarian Society for Microbiology 2008, 15-17 October 2008, Keszthely, Hungary Book of Abstracts p. 10.
2. **Márta, D.**, Takács, T., Gelencsér, E. (2007) Enzyme-linked immunanalytical methods for the detection of cereal allergens in food, "Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly" Scientific Conference, Faculty of Food Science, 7-8 November 2007, Budapest, Hungary, Book of Abstracts pp. 72-73.
3. **Márta, D.**, Horváth, K., Belák, Á., Andrásy, É., Farkas, J., Maráz, A. (2007) Modelling the deterioration process of refrigerated pork and investigation of pseudomonads populations with molecular methods, *Hungalimentaria 2007*, Scientific conference and professional exhibition, 25-26 October 2007, Budapest, Hungary. Book of Abstracts p. 75.

4. **Márta, D.** (2007): Immunanalytical methods for the detection of gliadin as wheat allergen, XXVIII. National Scientific Conference of Students, Section of Food Science I., 16-18 April 2007, Debrecen, Hungary. Book of Abstracts

Nemzetközi konferencia (abstract)

1. Wallin-Carlquist, N., **Márta, D.**, Borch, E., Rådström, P. (2010) Extended Expression of Staphylococcal Enterotoxins A and D in Pork Meat Products. Food Micro 2010, 30 August-3 September, 2010, Copenhagen, Denmark, Book of Abstracts
2. Wallin, N., Cao, R., **Márta, D.**, Sant'Ana da Silva, A., Schelin, J., Rådström, P. (2010) Acetic acid increases the phage-encoded enterotoxin A expression in *Staphylococcus aureus*. Food Micro 2010, 30 August-3 September, 2010, Copenhagen, Denmark, Book of Abstracts
3. **Márta, D.**, Wallin, N., Borch, E., Rådström, P. (2009) Staphylococcal enterotoxin A expression on ham, FEMS 2009, 3rd Congress of European Microbiologists Gothenburg, Sweden - June 28-July 2, 2009 Book of Abstracts
4. Wallin, N., Cao, R., Schelin, J., **Márta, D.**, Sant'Ana da Silva, A., Rådström, P. (2009) Investigating how acetic acid stress affects the prophage-encoded enterotoxin A expression in *Staphylococcus aureus*, FEMS 2009, 3rd Congress of European Microbiologists Gothenburg, Sweden - June 28-July 2, 2009 Book of Abstracts
5. **Márta, D.**, Horváth, K., Krascenics, K., Farkas, J., Maráz, A. (2008) Detection and identification of food spoiling *Pseudomonas* species during refrigerated storage of pork cutlet, Food Micro 2008, 1-4 September 2008, Aberdeen, Scotland, Book of Abstracts p. 254.
6. **Márta, D.**, Horváth, K., Belák, Á., Andrásy, É., Farkas, J., Maráz, A. (2007) Refrigerated storage of pork cutlet: monitoring and molecular identification of food spoiling *Pseudomonas* spp., Power of microbes in industry and environment 2007, 19-22 September 2007, Zadar Croatia. Book of Abstracts p. 121.
7. Horváth, K., **Márta, D.**, Andrásy, É., Tyahur, Sz., Farkas, J., Maráz, A. (2007) Studies on the development of specific bacterial spoilage biota in chilled minced pork meat, 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology 18-20 July 2007 – Budapest, Hungary, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, p.50.
8. Takács, K., Nagy, A., Gelencsér, É., **Márta, D.**, Pauk, J. (2006) Quantification of three major allergen factors of wheat. The First SAFE Consortium International Congress “Nutrition and Food Safety: Evaluation of Benefits and Risks” 11-14 June 2006 – Budapest, Hungary. Book of Abstracts pp. 98-99.