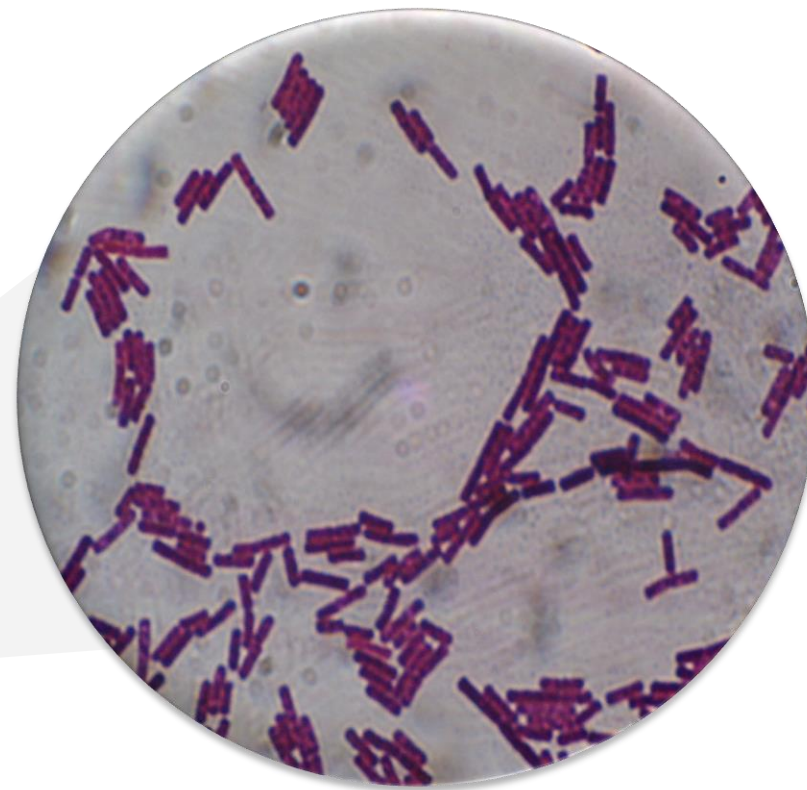
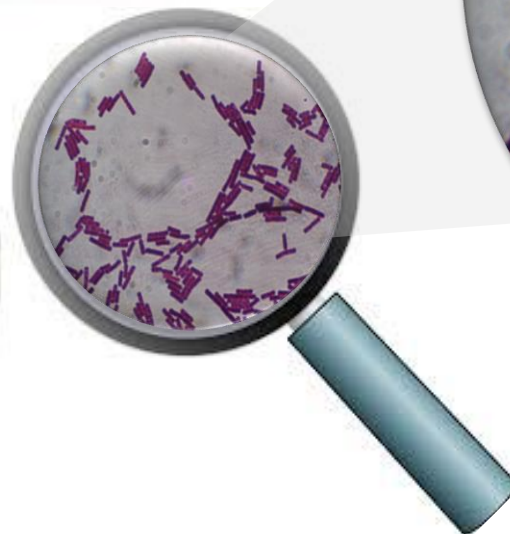




ÉLELMISZERFELDOLGOZÓ KÖRNYEZETÉBŐL IZOLÁLT BAKTÉRIUMOK
ANTAGONISTA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ELLEN
DEÁK BERNADETT, BELÁK ÁGNES, SOMOGYI GABRIELLA

Biokontroll és élelmiszerbiztonság

- Biztonságos, kémiai tartósító szerektől mentes élelmiszer előállítása
 - Érzékszervi tulajdonságok ne változzanak
 - Friss jellegű termékek, kényelmi termékek (RTE)
- Biokontroll:
 - Élő szervezetek alkalmazása más szervezetek gátlására
 - Alkalmazása kártevő állatok, gyomnövények, patogén mikroorganizmusok ellen
- Az élelmiszerben és annak feldolgozó környezetében található mikrobák között előfordulhatnak olyanok is, amelyek valamilyen módon képesek visszaszorítani az esetlegesen jelen levő patogének szaporodását

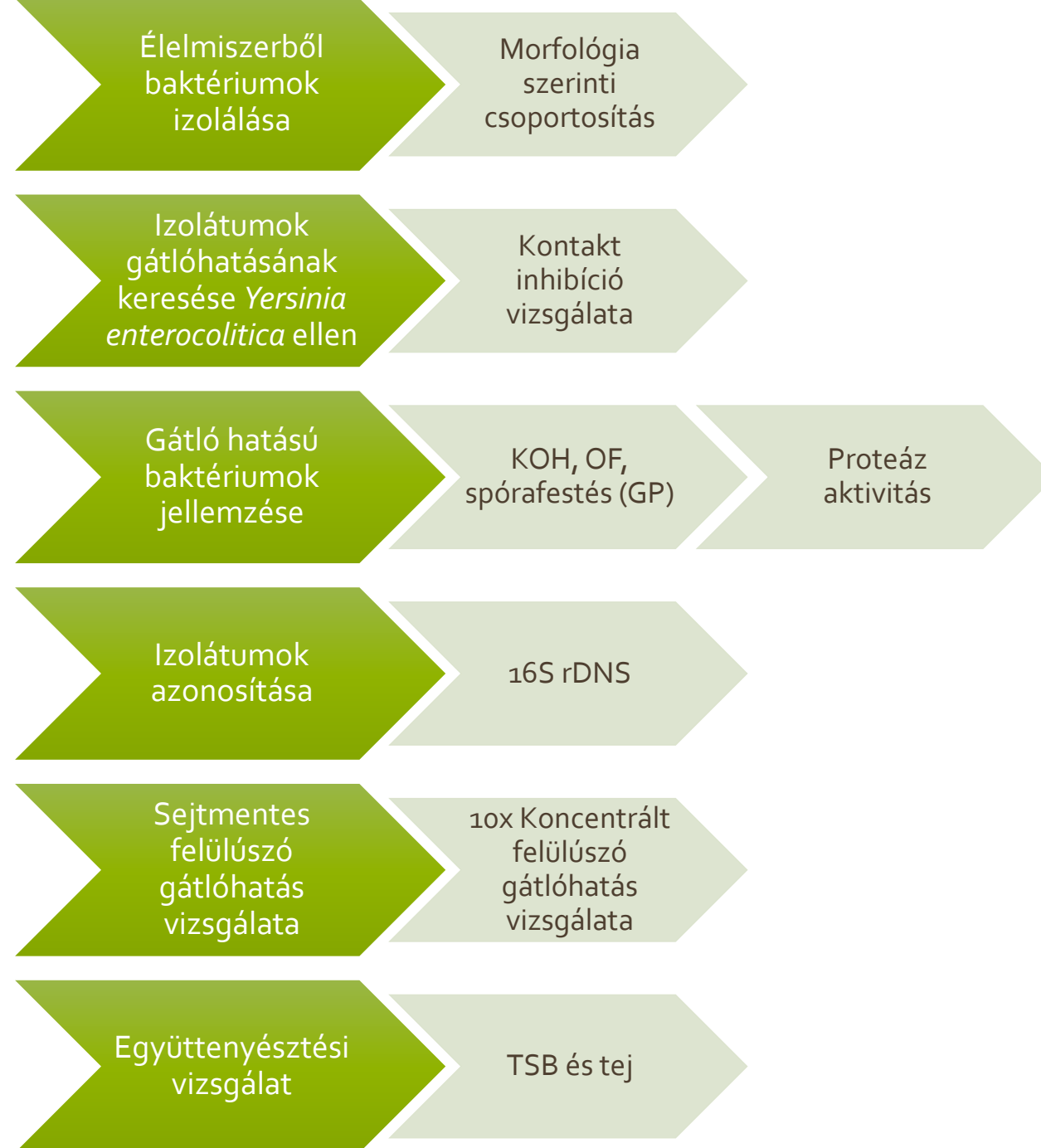


Yersinia enterocolitica

- Bélbaktériumok (Enterobacteriaceae) családja, *Yersinia* (korábban *Pasturella*) nemzetsége
- Humánpatogén faj
- Jellemzői:
 - Gram-negatív, aerob vagy fakultatív anaerob
 - Peritrich csillói vannak 22-25°C-on (szobahőmérsékleten) mozgásképes, de 37°C-on csillótlan
 - Pszichrotróf, hőm. opt.: 28-29 °C (-2 -+42 °C), a fagyasztva tárolást is hosszú ideig túléli, ismételt fagyasztást és felengedtetést is
 - pH opt.: 7-8 (min. pH: 4,2)
 - 7% NaCl gátolja
 - Hőtűrése nem kiemelkedő (D60=0,4-0,5perc tejben; z=4,5°C)
- Előfordulása:
 - Számos emlős (kutya, macska, patkány) béltraktusában
 - Gyakori szabad vizekben
 - Kecsketejben (általában pasztörözés nélkül használják fel)
 - Borjú, sertés, bárány, baromfi, tejtermékek, fagylalt
- Az összes előfordulás 65-90%-a élelmiszer eredetű. A betegség be- és kijelentésre kötelezett



Célkitűzések



Módszerek

- Izolálás élelmiszerrel érintkező felületekről és élelmiszerből
 - Vágóhíd
 - Zöldség feldolgozó üzem
 - Tojásüzem
 - Tejüzem
- Mintavételhez használt táptalaj: TSA vagy TSB
- TSA és WL agaron megfigyelt morfológia szerinti csoportosítás

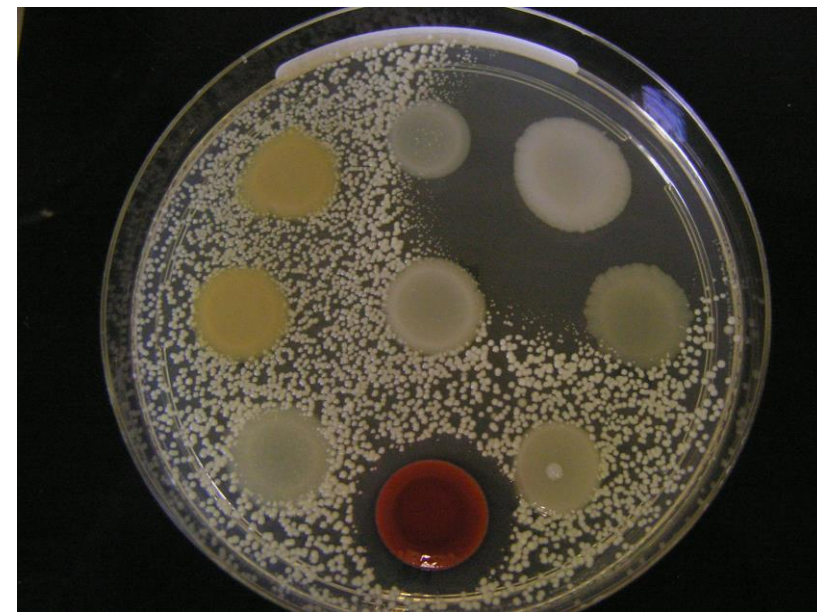


Módszerek

Izolátumok
gátlóhatásának
keresése *Yersinia*
enterocolitica ellen

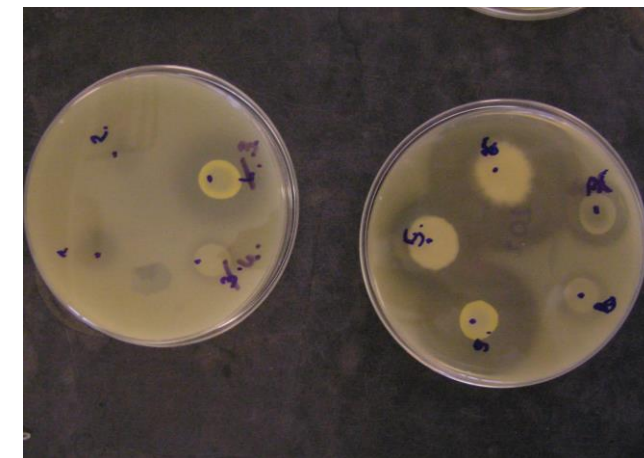
Kontakt
inhibíció
vizsgálata

- *Yersinia enterocolitica* (98001)-val masszívan leoltott TSA lemezekre tesztmikroba felcseppentése ($\sim 10^6$)
- Inkubálás nyolc hőmérsékleten : 5 °C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 42°C
- Leolvasás: egy kettő három és hat nap után
- Feltisztulási zóna keresése (részleges vagy teljes gátlás)



Módszerek

- KOH teszt Gram pozitív és Gram negatív baktériumok elkülönítésére
- Oxidatív-fermentatív teszt (glükóz)
- Spórafestés
- Proteáz aktivitás
 - Tejporos TGE agaron
 - Sejtszuszpenzió felcseppentése
 - Inkubálás: 20°C, 25°C, 30°C
 - Leolvasás 24, 48 és 120 órát követően
 - Feltisztulás megfigyelése



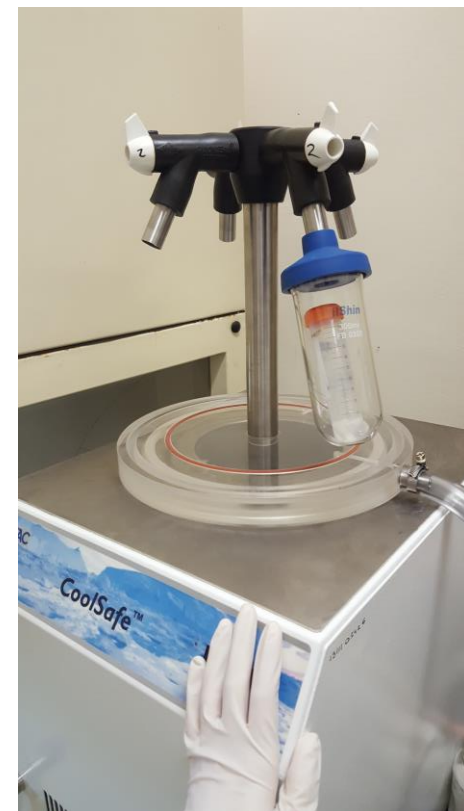
Módszerek

- Első lépésben miniatürizált identifikációs tesztekkel
 - API, BBL Crystal
- Azonosítás szekvenálással
 - 16S rDNS alapján
 - R1492 primer
 - NetBlast, EzTaxon



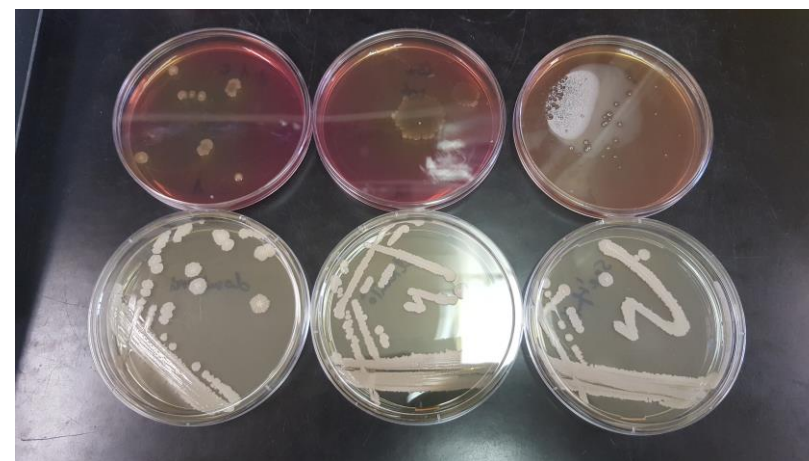
Módszerek

- Tesztmikróba TSB-ben
 - Inkubálás egy három és hat napig 25°C-on
- Sejtmentes felülúszó készítése
 - Centrifugálás (14000rpm, 4°C), szűrés
- *Yersinia* szaporodásának megfigyelése a felülúszó jelenlétében
 - Multiscan ascent , 595nm-en szaporodás detektálása
- Felülúszó bekonzentrálása liofilizálással
- Koncentrált felülúszó gátló hatásának megfigyelése



Módszerek

- Egy, a kontakt inhibíciós vizsgálat során jelentős gátlási zónával rendelkező izolátum kiválasztása CSE-T-4
- A gátló mikroba és a *Y. enterocolitica* beoltása TSB-be és UHT-tejbe
 - A beoltott koncentráció 1:1 és 1:10 arányú ($\sim 10^1$ patogén mind a két esetben)
- Inkubálás 4°C-on és 25°C-on
- Kioltás TSA és Mossel agar lemezekre egy, kettő, három és hat nap után
 - TSA: mind a két baktérium szaporodik
 - Mossel: *Yersinia* nem szaporodik

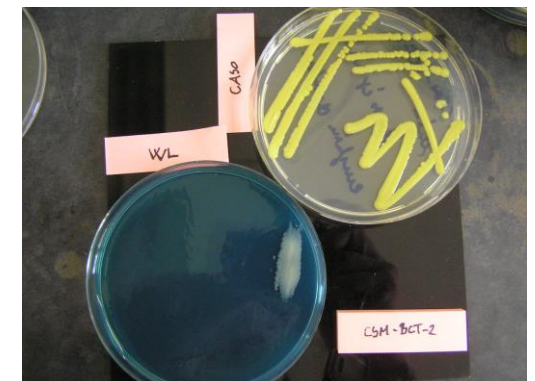
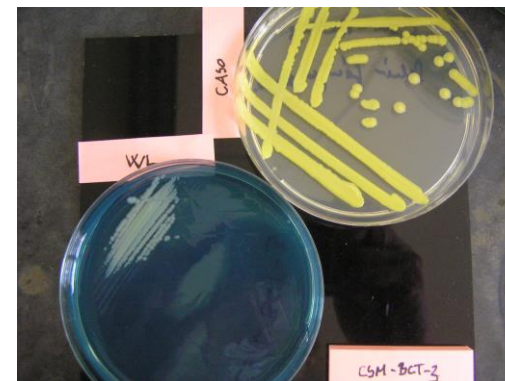
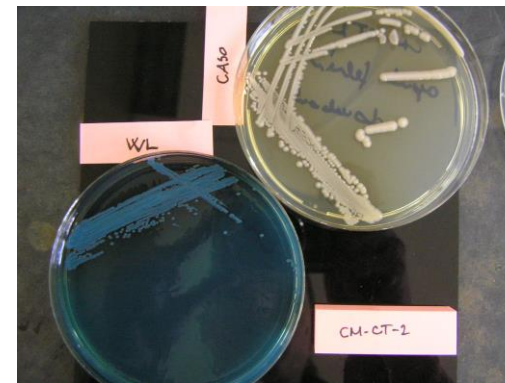
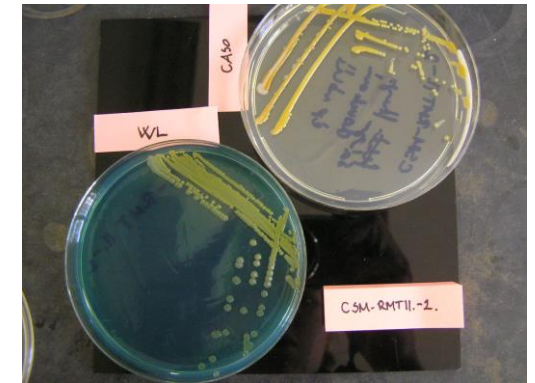


Együttenyésztési
vizsgálat

TSB és tej

Eredmények

- Összesen 78 izolátum került begyűjtésre négy helyről
- Morfológia alapján csoportosítva 68 féle izolátummal végeztünk további vizsgálatokat



Eredmények

- Az izolátumok közül 14 volt képes a *Yersinia enterocolitica* részleges vagy teljes gátlására kontakt inhibíciót figyelve
- A legjobb gátlóhatás
 - 15°C-30°C között
 - első és második napon

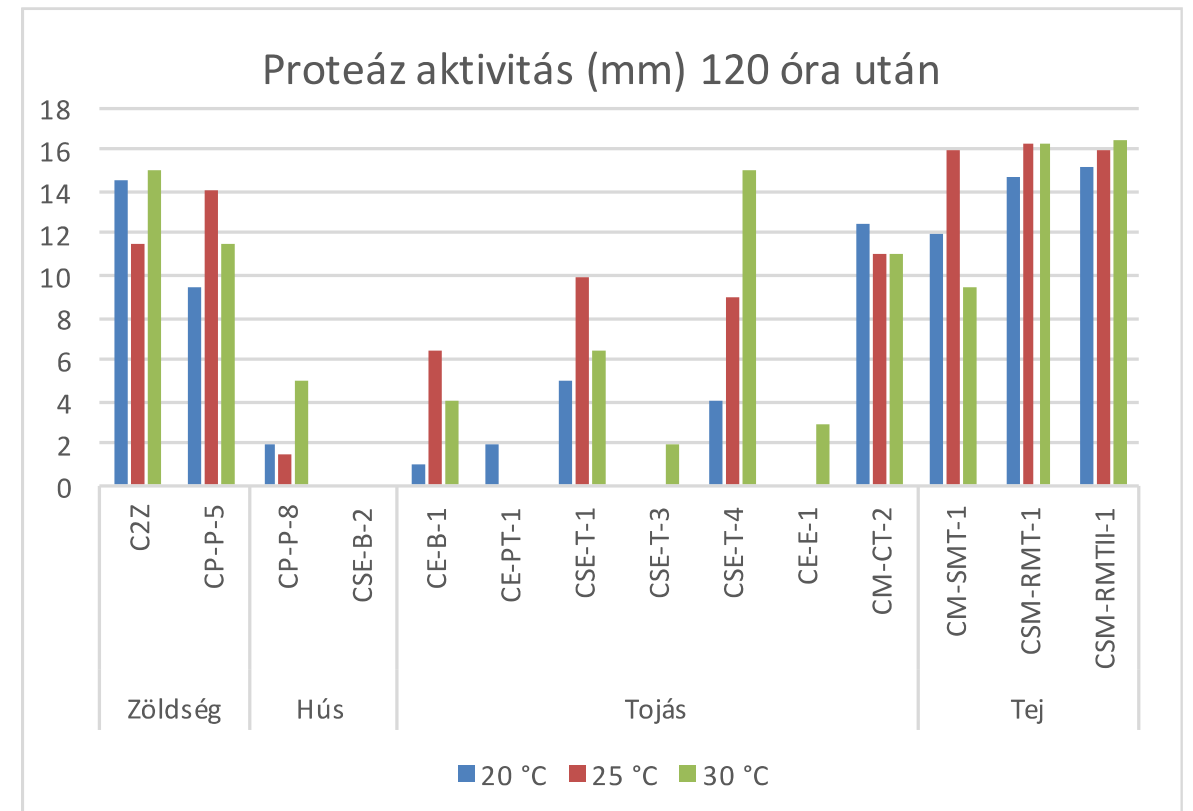


Forrás	Kód
Zöldség	C2Z
Hús	CP-P-5
	CP-P-8
Tojás	CSE-B-2
	CE-B-1
	CE-PT-1
	CSE-T-1
	CSE-T-3
	CSE-T-4
	CE-E-1
Tej	CM-CT-2
	CM-SMT-1
	CSM-RMT-1
	CSM-RMTII-1



Eredmények

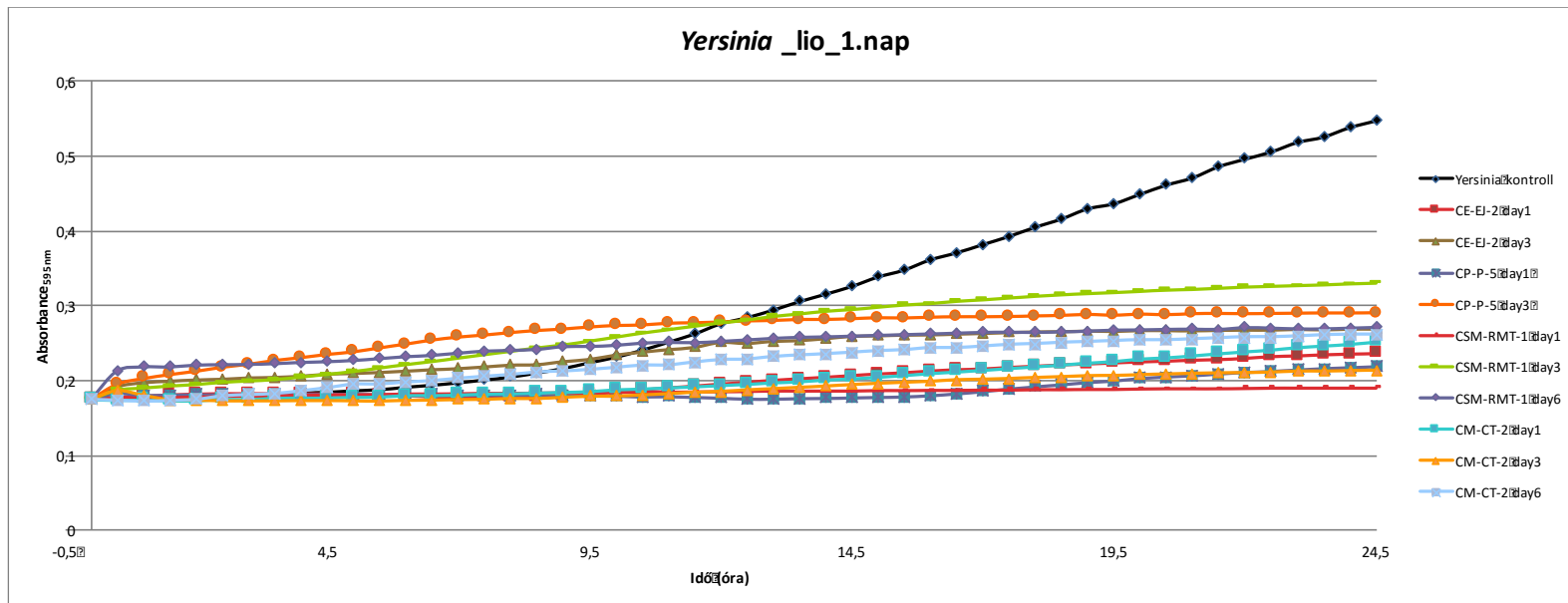
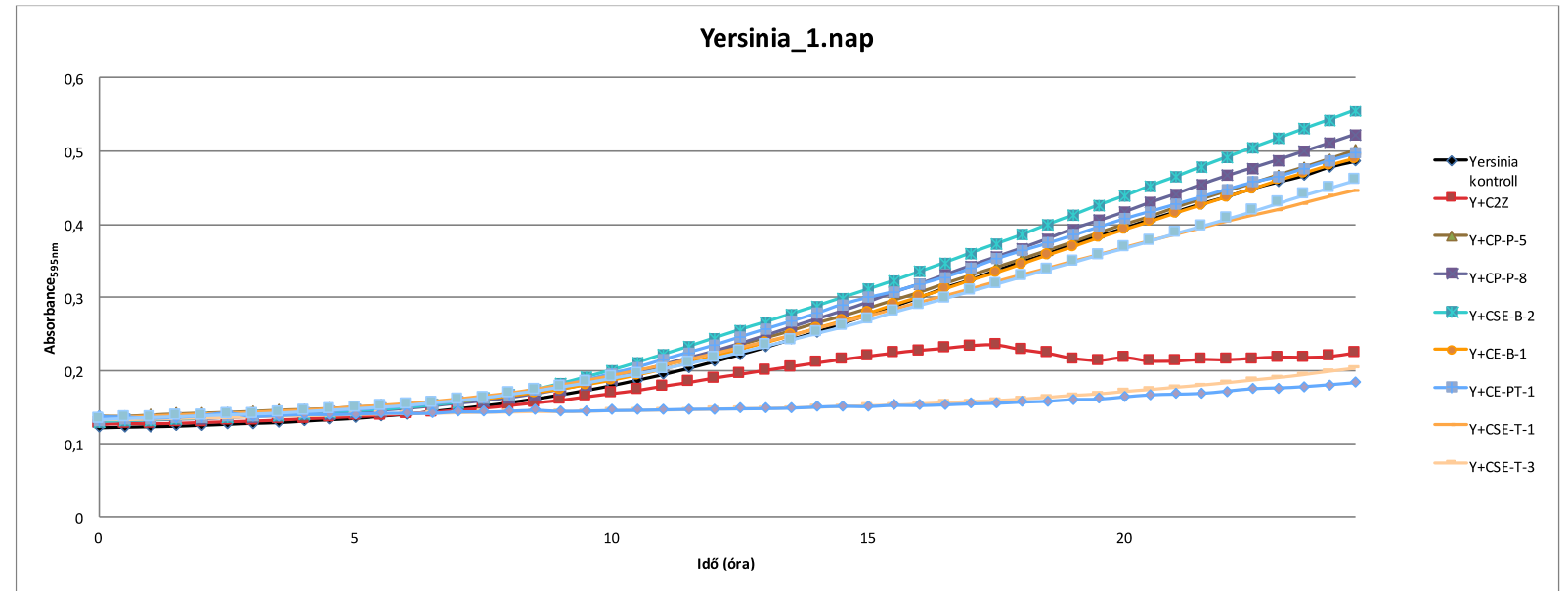
Forrás	Kód	OF (glükóz)	KOH	Spóra
Zöldség	C2Z	-	+	+
Hús	CP-P-5	O	-	-
	CP-P-8	F	-	+
Tojás	CSE-B-2	O	-	-
	CE-B-1	-	+	-
	CE-PT-1	-	+	-
	CSE-T-1	O/F	+	-
	CSE-T-3	-	+	-
	CSE-T-4	-	+	+
	CE-E-1	-	+	-
	CM-CT-2	-	-	-
Tej	CM-SMT-1	-	+	-
	CSM-RMT-1	O/F	-	-
	CSM-RMTII-1	O/F	-	-



Eredmények

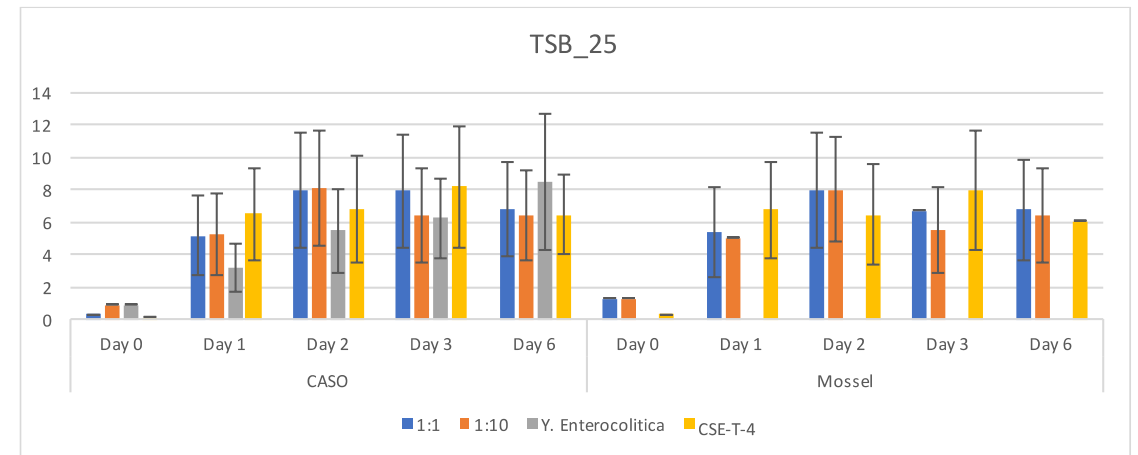
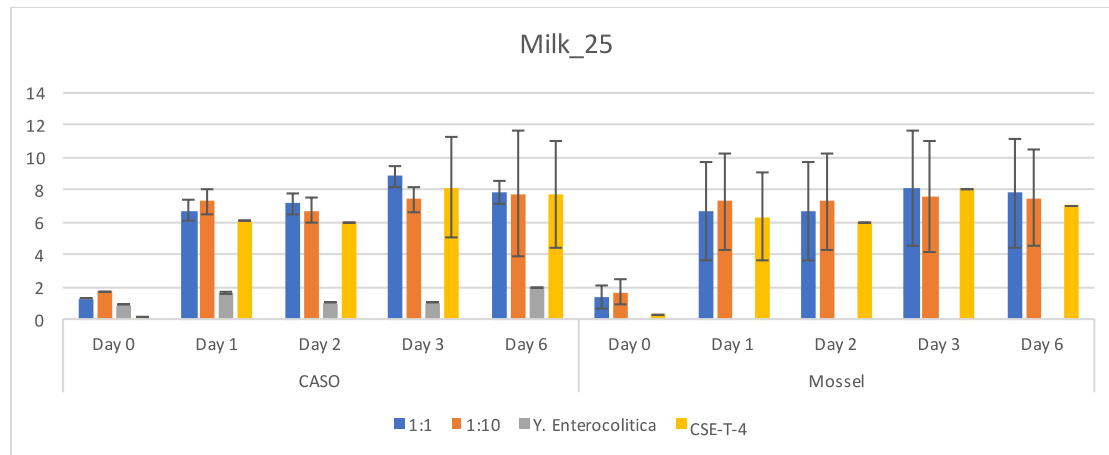
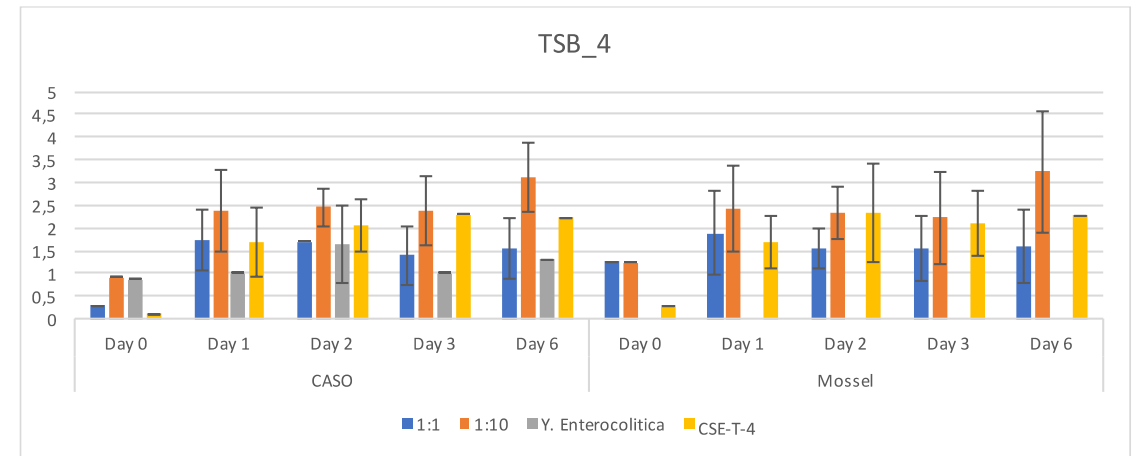
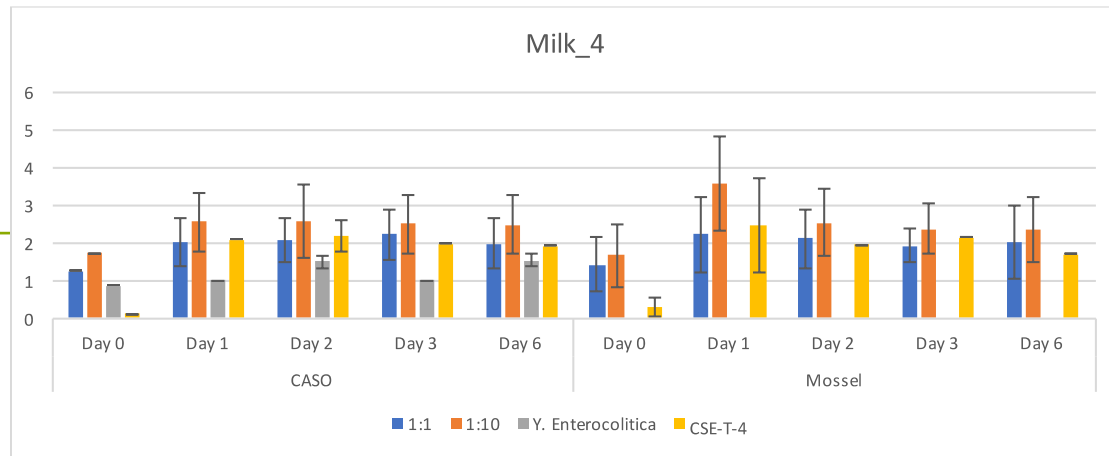
Forrás	Kód	API/BBL	szekvenálás
Zöldség	C2Z	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (99.91%)
Hús	CP-P-5	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i> (99.9%)
	CP-P-8	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Paenibacillus pabuli</i> (99.9%)
Tojás	CSE-B-2	<i>Acinetobacter baumannii/ 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%)
	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%)
Tej	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%)

Eredmények



Koncentrált felülúszók

Eredmények



→ Tejben jelenlévő természetes antimikrobás anyagok

Összefoglalás

- Élelmiszerfeldolgozó környezetéből sikerült potenciálisan antagonist baktériumok izolálása (*Y. enterocolitica* 98001 ellen vizsgálva)
- Kontakt inhibíció esetén a gátlóhatás hőmérsékleti optimuma 15°C -30°C
- Sejtmentes felülúszó gátlóhatása koncentrált (10x-es töménységű) esetben kedvező
- Szükséges a molekuláris azonosítás a fajok pontos meghatározásához környezeti izolátumok esetében
- A gátló komponensek
 - Feltehetően elsődleges metabolitok (a gátlóhatás 24 óra után megjelenik és akkor a legjelentősebb)
 - Koncentráltan tudnak kedvezőbb hatást kifejteni (folyadék tenyészetben minimális hatás)

Köszönöm a
megtisztelő
figyelmet!

