



Élelmiszertudományi Kar

***Listeria monocytogenes* törzsek gátlásának vizsgálata határfelület analízissel**

OTDK dolgozat

Hóbor Ilka

I. évf. MSc hallgató



TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005
TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

Témavezető(k):

Dr. Habil. Kiskó Gabriella

egyetemi docens

Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

Dr. Habil. Nguyen Duc Quang

egyetemi docens

Sör- és Szeszipari Tanszék

**Budapest
2012.**

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	2
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	2
2.1	Listeria fajok.....	2
2.2	Listeria monocytogenes	3
2.2.1	Felfedezés.....	3
2.2.2	Előfordulás.....	3
2.2.3	Morfológia és általános jellemzői.....	5
2.2.4	Szaporodás	6
2.2.5	Liszteriózis.....	7
2.2.6	Élelmiszer eredetű lisztéria megbetegedések.....	7
2.2.7	Szabályozás.....	8
2.3	Stresszhatások	9
2.3.1	Hőmérséklet.....	9
2.3.2	Vízaktivitás.....	10
2.3.3	pH	11
2.3.4	NaCl.....	11
2.3.5	Nizin.....	12
2.4	Gát technológia.....	13
3	A MUNKA CÉLJA.....	14
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	14
4.1	Felhasznált <i>Listeria monocytogenes</i> törzsek.....	14
4.2	Tápközegek	14
4.3	Vegyszerek.....	15
4.4	A kísérlet leírása	15
4.5	Kísérlettervezés	16
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	19
5.1	Baktérium szaporodása.....	19
5.2	Kombinált hatás vizsgálata.....	24
5.2.1	<i>Listeria monocytogenes</i> CCM 7202 törzs	25
5.2.2	Tejipari <i>Listeria monocytogenes</i> izolátumok	28
6	ÖSSZEFOGLALÁS	33
7	IRODALOMJEGYZÉK.....	35
8	MELLÉKLETEK	39

1 BEVEZETÉS

Napjainkban az élelmiszer előállítók a kíméletesebb élelmiszer feldolgozási eljárásokat részesítik előnyben azért, hogy a mai fogyasztói igényeknek megfelelően kevesebb kémiai tartósítószer és adalékanyagot használjanak fel. Ezeknek a kevésbé feldolgozott, természetesebb, kevesebb tartósítószer tartalmazó termékeknek a hátránya, hogy élelmiszerbiztonsági szempontból komoly problémákat okozhatnak. Az élelmiszerek eltarthatósági idejét hűtve tárolással próbálják meghosszabbítani, de gyakran nem lehet a hűtláncot megfelelően fenntartani és így a patogén mikroorganizmusok szaporodásával kell számolni.

A kíméletes tartósítási módszerek kidolgozása a modern élelmiszeripari kutatások középpontjában áll azért, hogy a patogén mikroorganizmusokkal szemben biztonságos termékeket lehessen előállítani. A mai fogyasztói igényeket kielégítő új, kíméletes technológiák kidolgozása biztonságos élelmiszerek előállítására élő kihívás mind az élelmiszertechnológusok, mind a mikrobiológusok számára. A *Listeria monocytogenes* ismertén ember és állatpatogén, mely hosszú ideig képes a számára kedvezőtlen környezeti körülmények között is élni és embernél súlyos megbetegedéseket okozni. A liszteriózis egy zoónotikus fertőzés, amely ritkán fordul elő, de tünetei súlyosak, halálozási aránya magas. Az élelmiszer eredetű emberi megbetegedéseket főként a fertőzött, illetve a szennyezett nyers tej és abból készült tejtermékek okozzák. A *Listeria monocytogenes* hosszú időn át életképes marad a tejben, a savanyodó tejben pedig szaporodásra is képes. Sokféle sajt szennyeződhet *Listeria monocytogenes*-sel, ezen belül is főleg a lágy sajtok. A kórokozó képes életben maradni a feldolgozott és érlelt sajtok számos különböző változatában: kecske és juhsajtok, ricotta, hispániai típusú sajtok, penésszel érlelt sajtok, Brie, Camembert, Feta sajtok. A Franciaországban készült lágy sajtok fokozottabban veszélyeztetettek a *Listeria monocytogenes* által, mivel az ott alkalmazott technológiában pasztörözetlen tejet is felhasználnak. Az élelmiszer eredetű humán liszteriózisok számának emelkedése szükségessé teszi a *Listeria monocytogenes* stressztényezőkkel (pH, só, antimikrobiális anyagok) szembeni ellenállóképességének alapos vizsgálatát.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 *Listeria* fajok

Taxonomológia szerint a *Listeria* nemzetség a *Listeriaceae* családban, a *Bacillales* rendben, a *Bacilli* osztályban és a *Firmicutes* törzsben található (Deák, 2006), amelybe általában Gram-pozitív, kis G+C tartalmú baktériumcsoportok tartoznak. A G+C tartalom a mol%-ban kifejezett aránya a DNS guanin-citozin tartalmának. A genotípus alapján történő rendszerezésnek egyik fontos állomása a G+C tartalom meghatározása.

A *Listeria* nemzetségbe olyan baktériumok sorolhatók, amelyek spórátlanok, kataláz pozitívok, pálcá alakúak. A *Listeria* fajok törzsfajlódéstanilag hasonlóak a *Lactobacillus*-okhoz, azonban a lisztériák fakultatív anaerobok, míg a *Lactobacillus*-ok aerotoleráns anaerobok. *Listeria* fajok képesek a tejsavas erjesztésre, úgy mint a *Lactobacillus*-ok, de nem képeznek gázt a glükózból (Deák, 2006).

A *Listeria* nemzetségben belül elkülönített fajok: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri* (Hudson et al., 1994). Az elmúlt évben két új fajt is leírtak, a *L. rocourtiae*-t (Leclercq et al., 2010) és a *L. marthii*-t (Graves et al., 2010). A *Listeria monocytogenes*-nek 13 szerotípusa ismert, közülük három az 1/2a, az 1/2b, és a 4b szerotípus képes megbetegedést okozni (Rocourt és Buchrieser, 2007).

2.2 *Listeria monocytogenes*

2.2.1 Felfedezés

Franciaországban Hayem 1891-ben, Németországban Henle 1893-ban talált Gram pozitív pálcákat betegek szöveteiben, akik valószínűleg lisztériózis következtében hunytak el. Ennek ellenére Svédországban Hülphers 1911-ben jegyzett fel egy konkrét esetet, azzal a mikroorganizmussal kapcsolatban, amit ma *Listeria monocytogenes*-nek hívnak. Az általa izolált baktériumot ő *Bacillus hepatis*-nek nevezte el. Ennek a baktériumnak a jellemzői megegyeznek a ma *Listeria monocytogenes*-ként ismert baktériummal.

1917-ben Atkinson jegyzett le egy agyhártyagyulladás járványt, amelyért feltehetően a *Listeria monocytogenes* volt a felelős. 1926-ban Murray és munkatársai jellemzték a baktériumot, amit ők *Bacterium monocytogenes*-nek neveztek. Az általuk jellemzett baktériumot a beteg állatok májából izolálták (Gray és Killinger, 1966). 1927-ben Pirie ugróegerekből izolálta és *Listerella hepatolytica*-nak nevezte el. Rájöttek, hogy a *Bacterium monocytogenes* és a *Listerella hepatolytica* ugyanaz a mikroorganizmus, a nevét *Listeria monocytogenes*-re változtatták (Farber és Peterkin, 2000). Nyfeldt 1929-ben három emberből izolálta a baktériumot, akik fertőző mononukleózis-szerű betegségben szenvedtek, ezt tekinthetjük a *Listeria monocytogenes* első hivatalos izolálásának emberből (Potel, 1952). Gray és Killinger 1966-ban hozták nyilvánosságra a klasszikussá vált ismertetőjüket a *Listeria monocytogenes*-ről és az általa okozott emberi megbetegedésekről. 1981-ben derült ki, hogy az *Listeria monocytogenes* embert megbetegítő kórokozó.

2.2.2 Előfordulás

A *Listeria monocytogenes* természetes előfordulási helye a talaj, de megtalálható a természetes vizekben, iszapban, a növényzeten, a földdel szennyezett takarmányokban, vágóhídi hulladékokban, egészséges és tőgyulladással tehenek tejében, humán és állati bélsárban. Jelen lehet állatok

garatüregében, belében, húgy- és ivarszervi traktusában, valamint az előbb említett helyekről származó váladékokkal szennyezett minden helyen. Előfordulhat nyers húson illetve húskészítményekben (vágóállatoknál elsősorban juhban, kecskében, ritkábban szarvasmarhában, sertésben és házinyúlban, esetenként baromfiban), lágú sajtokban és zöldségeken. Élelmiszerfeldolgozó üzemekben is megtalálható, ahová elsősorban talajeredetű szennyeződésekkel juthat be a dolgozók cipőjén, ruháján, szállítóeszközökön, valamint szennyezett állati kultakaróról, állati és növényi nyersanyagokról illetve a patogént hordozó emberi testfelületekről is (Laczay, 2008).

Az alábbi élelmiszercsoportokban fordulhat elő a *Listeria monocytogenes*:

- nyers zöldségek
- fermentált húson, húskészítmények, nyers és füstölt halak
- nyers tej, tejtermékek, lágú sajtok
- fogyasztásra kész élelmiszerek (Ready-to-eat, RTE).

Kockázatos ételnek minősül minden hűtést igénylő, 5 napon túl hűtőben tárolt élelmiszer.

2.2.2.1 Nyers zöldségek

Gyakran megtalálható nyers zöldségekben, így például káposztában, burgonyában, retekben, uborkában és a belőlük készült salátákban (Beuchat, 1996). Ha hosszabban tároljuk őket szaporodásra is képesek a zöldségek felszínén.

A kis savtartalmú zöldségek, mint például a paradicsom és a sárgarépa nem nyújtanak olyan jó táptalajt az *Listeria monocytogenes* szaporodásához (Beuchet és Brackett, 1990). Ugyanakkor a mérsékelt savas növényi élelmiszerek és a csíráztatott magvakból előállítottak is hordozói és alkalmanként emberi megbetegedések forrásai lehetnek (Laczay, 2008).

A zöldségek széleskörű szennyezettsége valószínűleg több forrásból is ered. Szennyeződhetnek a talaj, a víz, szennyvíz, trágya, és a rothadó növények által is. Az *Listeria monocytogenes* által okozott szennyeződések száma a frissen vágott zöldségféléken 0-19% lehet (Carlin és Nguyen, 1994).

2.2.2.2 Fermentált húson, húskészítmények, nyers és füstölt halak

A *Listeria monocytogenes* szaporodása a húsiparban is problémát jelent. Kimutatható marhahúsból, baromfitermékekből, sertéshúsból, sonkából, darált húsból, füstölt és érlelt kolbászokból, szalámiokból, pástétomból, különböző virslifélékből (hot dog), aszpikos sertésnyelvből.

A *Listeria monocytogenes* növekedése húsonban nagymértékben függ a hús hőmérsékletétől, a pH-jától, a szöveteinek típusától és a jelen lévő háttér mikrobiótától. Azokon a hústermékeken jól szaporodik, amelyek pH-ja közel 6 vagy a felett található, az 5 pH alatti húson a szaporodás gyenge vagy egyáltalán nem kimutatható (Glass és Doyle, 1989).

A baktérium a tengeri eredetű élelmiszerekben és halfélékben is előfordulhat. Friss, fagyasztott, feldolgozott tengeri halakban, sült garnélarákban, füstölt kagylóban, halban, lazacban, tőkehal ikrában, főtt halban, homárban, nem megfelelően átsütött halakban. Kismértékben mutatható ki szárított és sózott halakban (Emberek, 1994).

2.2.2.3 Nyers tej, tejtermékek, lágy sajtok

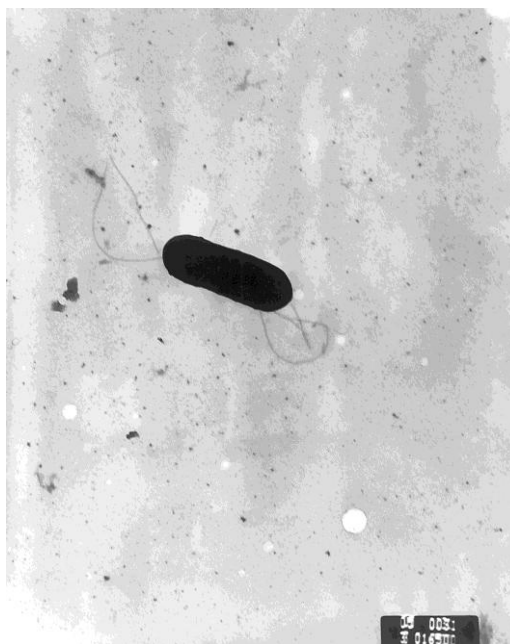
Az élelmiszer eredetű emberi megbetegedéseket főként a fertőzött, illetve a szennyezett nyers tej és abból készült tejtermékek okozzák. Veszélyes lehet a pasztörözött, pasztöröztelen tej, pasztörözött csokis tej, anyatej és főként a juh- és kecsketej (Laczay, 2008). A *Listeria monocytogenes* hosszú időn át életképes marad a tejben, a savanyodó tejben pedig szaporodásra is képes (Bíró, 1999).

Sokféle sajt szennyeződhet *Listeria monocytogenes*-el, ezen belül is főleg a lágysajtok. A lágysajtokban nagy koncentrációban, 10^5 és 10^7 telepképző egységben volt grammonként kimutatható (Loncarevic et al., 1995). Képes életben maradni például a kecske és juhsajtokban, ricotta-ban, hispániai típusú sajtokban, penésszel érlelt sajtokban, Brie-ben, Camambert-ben, Feta sajtokban.

A franciaországi lágy sajtok a pasztöröztelen tej felhasználásának köszönhetően, még kedvezőbb táptalajt nyújtanak a *Listeria monocytogenes* kialakulásához. Ritkán mutatható ki jégkrémekben, vajban, joghurtban. A joghurt elkészítésénél alkalmazott termofil tejsavbaktériumok gátolják a *Listeria monocytogenes* szaporodását (Genigeorgis et al., 1991).

2.2.3 Morfológia és általános jellemzői

A *Listeria monocytogenes* csillós, rövid pálca alakú, Gram pozitív, spórátlan, tokkal nem rendelkező, 1-2 μm hosszú (1. ábra), légzését tekintve fakultatív anaerob baktérium (Laczay, 2008). A sejtek egyesével és láncformában is előfordulnak, de V vagy Y formába is rendeződhetnek. Elvértve kókkoid formát is ölhetnek, ilyenkor könnyen összetéveszthetők a *Streptococcus*-okkal (Rocourt és Buchrieser, 2007). Jellegzetes bukfencező mozgást végez, mivel peritrich elhelyezkedésű ostorai vannak, de csak szűk hőmérsékleti tartományban képes a helyváltoztatásra 20-25 °C között (Bíró, 2001).



1. ábra: *Listeria monocytogenes* pásztázó elektromikroszkópiai képe
http://hu.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes

A *Listeria monocytogenes* kataláz-pozitív, az eszkulint hidrolizálja, az arginint viszont nem. Glükózból, maltózból savat képez, a mannitot és a xilózt azonban nem bontja. Kórokozó képessége a törzsek hemolizáló (az α -hemolizáló törzsek nem patogének, a β -hemolizáló törzsek patogének míg a γ -hemolizáló törzsek nem mutatnak hemolitikus aktivitást) és lipolitikus aktivitásával, valamint a sejtfalban található, monocytosist okozó faktor és a sejtfal lipoid anyagainak toxikus hatásával áll kapcsolatban (Laczay, 2008).

2.2.4 Szaporodás

A *Listeria monocytogenes* sótűrő, pszichrofil baktérium. Szaporodásának hőmérsékleti optimuma 30-35 C°, de széles hőmérsékleti tartományban (-1,5-42 C°) is képes a szaporodásra. A patogén baktérium extra körülmények között is képes szaporodni például hűtőhőmérsékleten 5 C° alatt, széles pH tartományon 4,0-9,6, 10%-os NaCl tartalmú közegben (Hudson et al., 1994). Majd egy évig képes életben maradni 16% NaCl jelenlétében pH 6,0 közegben. Általában túléli a szárítást csakúgy, mint a fagyasztást. A fagyasztás közben a felületeken biofilmet képez (Laczay, 2008). *Listeria monocytogenes* növekedése lassú a fagyasztott élelmiszereken, generációs ideje 22-61 óráig terjed, azonban azokon az élelmiszereken, amelyek hőmérséklete túlhaladja a 10 C°-ot, a generációs idő általában 10-13 óra között volt megfigyelhető (Whiting és Buchanan, 1994).

A *Listeria monocytogenes* azon kevés élelmiszer-eredetű patogén közé tartozik, melyek képesek $a_w=0,93$ alatt, akár $a_w=0,9$ értéken is szaporodni (Lado és Yousef, 2007). A talajban hónapokig életképes maradhat. Hőkezeléssel, már pasztörözéssel is és a fertőtlenítőszeres többségével elpusztítható. A húsok, és hústermékek esetében a megfelelő főzés vagy sütés teljes biztonságot

nyújt a hűtés viszont nem elegendő. Az élelmiszeripari üzemekben kialakuló körülmények, a nedves felületek, maradékok kedvezhetnek az előfordulásának, mert lehetővé teszik a patogén megtelepedését és szaporodását a gyártóeszközökön (Gandhi és Chikindas, 2006). A baktérium széles elterjedésének oka tehát, hogy hosszú ideig képes a számára kedvezőtlen környezeti körülmények között is élni.

2.2.5 Liszteriózis

A *Listeria monocytogenes* által okozott betegségeket összefoglaló néven liszteriózisnak nevezzük. Ritkán előforduló, de súlyos, nagy halálozási arányú betegség, amely változatos tüneteket okoz. A jó immunállapotú, egészséges személyeknél a fertőzést követően nem alakulnak ki klinikai tünetek, de a meggyengült immunrendszerűek megbetegedhetnek. A legjellemzőbb tünetek: láz, rosszközhérzet, hányinger, hasi fájdalom, fejfájás, hányás, hasmenés, felső légúti fertőzésre utaló tünetek, izomfájdalom.

A liszteriózisnak komolyabb szövődményei is lehetnek - agyhártyagyulladás, agyvelőgyulladás, vérmérgezés, endokarditisz- és legrosszabb esetben halállal is végződhet. A legveszélyeztetettebbek a legyengült immunrendszerűek, kisgyermekek, idősek, alkoholisták, betegek, terhes nők, károsodott celluláris immunitású betegek (pl. transzplantáción átesettek, AIDS-betegek, kemoterápiás kezelés alatt álló daganatos betegek). A terhes nőknél igen gyakran influenzaszerű tünetek jelentkeznek. De még akkor is ha az anya fertőzése enyhe a magzatra, és az újszülöttre nézve igen veszélyes lehet a betegség. A magzatnál abortusz vagy koraszülés, halvaszülés következhet be, az újszülöttnél keringési, légzési elégtelenség, tüdőgyulladás vagy szepszis jelentkezhet (Rodler, 2005). A betegség lappangási ideje változó, a tünetek akár 24 órával is megjelenhetnek a fertőzött élelmiszer elfogyasztása után, vagy akár 2-90 nap múlva (Szalka et al., 2005).

2.2.6 Élelmiszer eredetű lisztéria megbetegedések

A liszteriózis egy zoónotikus fertőzés, amely ritkábban fordul elő, de tünetei súlyosak, halálozási aránya magas lehet (**1. táblázat**). Magyarországon évente 1 millió emberre egy-kettő liszteriózis megbetegedés jut. 2007-ben 9, 2008-ban 19, 2009-ben 16 esetet regisztráltak (<http://www.mebih.gov.hu/>).

Liszteriózis betegség megelőzése

Hűtést igénylő élelmiszereket 5 napon túl nem szabad a hűtőszekrényben tárolni. A hűtőszekrény belsejét tisztán kell tartani, rendszeresen ki kell mosni és fertőtleníteni, a hőmérséklete ne haladja meg a 4 C°-t. Nyers állati ételt nem szabad fogyasztani, az ételeket meg kell sütni vagy főzni, úgy hogy a belsejük minimum 2 percig legalább a 75 C°-t érje el (<http://www.mebih.gov.hu/> B).

1. táblázat: Listeriózis járványok

Évszám	Hely	Fertőzött élelmiszer	Története
1980	Új-Zéland	hal és halkészítmények	29 beteg, ebből 9 halott (Lennon et al., 1984)
1981	Kanada	káposzta	Kb. 40 beteg, jelentős számban terhes nők (Schlech et al., 1983)
1983	USA	pasztörözött tej	49 beteg, 14-en meghaltak
1984	Svájc	Lágy sajt	57 beteg, 19-en meghaltak
1992	Franciaország	Fogyasztásra kész disznóhús	279 eset, ebből kb. 85 halállal végződött
1997	Olaszország	Kukoricasaláta	1566 eset, 292 embernek volt szüksége súlyos tüneteik miatt kórházi kezelésre (Aureli et al., 2000)
1998-1999	USA	Hot dog	101 betegből 21-en meghaltak (A: MÉBIH)
1998-1999	Finnország	vaj	25 megbetegedés, 6 haláleset (EFSA, 2007)
2000	USA	pulykahús	29 betegből ketten meghaltak (A: MÉBIH)
2006	EU országaiban 9 járvány	Svájcban, Cseh- és, Németországban lágy sajt	Összesen 120 beteg, 74%-uk került kórházba, 17-en meghaltak (EFSA, 2007)
2008	Kanada	Szennyezett hús	56 megbetegedésből 20 végződött halállal (C: MÉBIH)
2009	Ausztria	sajt	12 beteg, 2 haláleset (A: MÉBIH)

2.2.7 Szabályozás

A 2005. november 15-i 2073/2005/EK (Európai Közösségek Bizottságának) rendelete az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól szól. Mikrobiológiai kritériumokat állít fel az egyes mikroorganizmusokra, és meghatározza azokat a higiéniai szabályokat, amelyeket az élelmiszer-ipari vállalkozóknak be kell tartaniuk (1441/2007/EK RENDELET).

Az SCVPH a közegészségügyi vonatkozású állat-egészségügyi intézkedésekkel foglalkozó tudományos bizottság szakvéleményt adott ki a *Listeria monocytogenes*-ről. A szakvélemény előírja (2. táblázat), hogy az élelmiszerekben a *Listeria monocytogenes* száma a 100 cfu (telepképző egység)/g érték alatt maradjon (2073/2005/EK RENDELET).

2. táblázat: Élelmiszer-biztonsági kritériumok (1441/2007/EK RENDELET)

Élelmiszer-kategória	Határérték	Az a fázis, ahol a kritériumot	Megjegyzés
----------------------	------------	--------------------------------	------------

		alkalmazni kell	
„1.1. Csecsemőknek szánt, fogyasztásra kész élelmiszerek és speciális gyógyászati célra szánt, fogyasztásra kész élelmiszerek	25 g-ban nincs jelen	Forgalomba hozott termékek, eltarthatósági idejük alatt	
1.2. Az <i>L. monocytogenes</i> szaporodását elősegítő fogyasztásra kész élelmiszerek, a csecsemőknek szánt, fogyasztásra kész élelmiszerek és a speciális gyógyászati célra szánt, fogyasztásra kész élelmiszerek kivételével	100 cfu/g	Forgalomba hozott termékek, eltarthatósági idejük alatt	Ez a kritérium akkor alkalmazandó, ha a gyártó az illetékes hatóság számára elfogadható módon igazolni tudja, hogy a termék eltarthatósági ideje alatt mindvégig a 100 cfu/g határérték alatt marad. Az élelmiszer-ipari vállalkozó meghatározhat a technológián belül közbenső határértékeket, melyeknek elegendően kicsinek kell lenniük annak biztosítása érdekében, hogy a termék az eltarthatósági idő végén a 100 cfu/g
	25 g-ban nincs jelen	Mielőtt az élelmiszer kikerül az azt előállító élelmiszeripari vállalkozó közvetlen ellenőrzése alól	Ezt a kritériumot az előállító élelmiszer-ipari vállalkozó közvetlen ellenőrzése alól még ki nem került termékekre kell alkalmazni minden olyan esetben, amikor a vállalkozó nem tudja az illetékes hatóság számára elfogadható módon igazolni, hogy a termék eltarthatósági ideje alatt mindvégig a 100 cfu/g határérték alatt marad.
1.3. Az <i>L. monocytogenes</i> szaporodását nem elősegítő, fogyasztásra kész élelmiszerek a csecsemőknek szánt, fogyasztásra kész élelmiszerek és a speciális gyógyászati célra szánt fogyasztásra kész élelmiszerek kivételével	100 cfu/g	Forgalomba hozott termékek, eltarthatósági idejük alatt”	

2.3 Stresszhatások

Ahhoz, hogy a mikroorganizmusok kedvezőtlen környezetbe jussanak élettevékenységeiket kell megváltoztatni. Ezt a tartósítással érhetjük el. A tartósítás magában foglalja az összes olyan eljárást, amellyel az élelmiszereket megvédhetjük a romlástól. A nyersanyagok ezáltal megtarthatják értékes anyagaikat, romlásmentesen tárolhatóak, és a fogyasztás időtartama is nő. A tartósítással azonban stresszhatások érik a mikroorganizmusokat, melyek megpróbálnak alkalmazkodni az új feltételekhez.

2.3.1 Hőmérséklet

A *Listeria monocytogenes* megfelelő tápközegben -1,5 – 45 °C közötti hőmérsékleten képes szaporodni, habár az optimális szaporodási hőmérséklet számára a 30 – 35 °C. Az 50 °C feletti hőmérséklet a patogénre letális hatást fejt ki, a 0 °C alatti pedig inaktíválja, mert az élelmiszer elkezd megfagyni (Lado és Yousef, 2007).

Az élelmiszertartósításban gondot jelent, hogy a *Listeria monocytogenes* hűtési hőmérsékleten is képes szaporodni és fagyasztási hőmérsékleten életben maradni. Kísérletek bizonyították, hogy -18 – (- 20) °C közötti hőmérsékleten életben tudott maradni 3 hónapon át a patogénnel beoltott marha, virsli, kukorica, hal, garnélarák, jégkrém mintákban és ez alatt az idő alatt egy nagyságrendnyi csökkenést mutatott (Palumbo és Williams, 1991).

2.3.2 Vízáktívítás

A mikroorganizmusok szaporodása vízhez kötött, ez azt jelenti, hogy az adott élelmiszer nedvességtartalma befolyásolja a mikroba szaporodását. A vízáktívítás (a_w) egy olyan viszonyszám, amely megmutatja, hogy a termék nedvességtartalmából képződő víz parciális gőznyomása hányad része a tiszta víz parciális gőznyomásának adott hőmérsékleten. A vízáktívítás értéke függ az élelmiszer nedvességtartalmától, a hőmérséklettől és a termék kémiai összetételétől (<http://webcache.googleusercontent.com/>)

Az a_w érték alapján az élelmiszereket három csoportra bonthatjuk. A magas víztartalmú élelmiszerek (HMF) a_w értéke 0,99-0,9, mint például friss hús, friss hal, friss és konzerv gyümölcs és zöldség, virslik, vaj, tej, majonéz, sajtok (cheddar, münster), sonka, száraz kolbász, gyümölcslé koncentrátum. A közepes víztartalmú élelmiszerek (IMF) a_w értéke 0,9-0,6 érlelt sajt, szalámi-árak, dzsemek, gyümölcs torták, szárazárak, narancs juice koncentrátum, margarin, gyümölcs juice koncentrátum, szirupok, lisztek, sütőipari termékek, kondenzált tej, lekvárok, marcipán, melasz, szárított füge, sózott hal, dió-mogyoró, nyers cukorrépa, gabonafélék, szárított gyümölcsök, karamell, őrölt kávé, medvecukor, parmezán/sprinz sajtféleségek. Az alacsony víztartalmú élelmiszerek (LMF) a_w értéke 0,6-0,0 méz, tészta (nokedli, ravioli) csokoládé, bonbonok, rágógumi, fűszerek, kakaó, tojáspor, szárított burgonya, krékek, piskóták, corn flakes, levespor, poralapú tortakeverék, szárított tejpor, szárított zöldségek, fagyasztva szárított termékek, nescafé, gyógyszeripari porok. Az alacsony víztartalmú élelmiszerekben a mikroorganizmusok teljesen gátolva vannak, míg a közepes víztartalmúak stabilitását jelentősen, a magas víztartalmú termékek eltarthatóságát pedig döntően befolyásolja a magas víztartalom. A vízáktívítás csökkentésére szolgálnak a tradicionális tartósítási módszerek, mint például a szárítás, a sózás vagy cukor hozzáadása az élelmiszerekhez (<http://www.vitaliskft.com/>).

Az alacsonyabb hőmérséklet és a vízáktívítás biztosítja, hogy a *Listeria monocytogenes* ne tudjon szaporodni az élelmiszerekben, a túlélése pedig függ a csökkentett nedvességtartalmú közegben a vízáktívítás lecsökkentésére alkalmazott oldott anyagtól. A túlélés mértéke megegyező a_w értékeknél, de eltérő oldott anyagok esetén propilén glikol, NaCl, szacharóz, glicerín sorrendben növekszik (Miller, 1992).

2.3.3 pH

A *Listeria monocytogenes* a természetben a savas eső, a trágyázás és a silózás által, valamint az emberi szervezetben a gyomron áthaladva, illetve a fermentált élelmiszerekben is leginkább a savas környezettel találkozunk. A patogén képes alkalmazkodni a savas körülményekhez. Savtűrésének kialakulása függ a szaporodás fázisától, a törzs típusától, illetve az alkalmazott pH értékétől. A baktérium pusztulását okozó letális savas pH-val szembeni ellenálló képessége javulhat, ha többször kerül enyhén savas pH-jú környezetbe (Ryser és Marth, 1988/A). A sejt úgy tud védekezni a gyengén savas kémhatású közeg ellen, hogy gyorsan kijuttatja magából a felesleges belső protonokat. Egy kritikus pH szintet átlépve a sejt már nem képes ezt véghezvinni, így a citoplazma pH-ja nem védi a patogén életműködését. A citoplazma elsavasodása ahhoz vezet, hogy lecsökken a membránon keresztüli proton transzport, azaz a sejt életműködését fenntartó energia megszűnik (Stratford és Anslow, 1998; Young és Foegeding, 1993).

A *Listeria monocytogenes* semleges pH (pH 6,0 – 8,0) tartományban tud a legjobban szaporodni. Gyengén savas kémhatású élelmiszerekben és még a savas, pH 4 – 3,6 körülmények között is képes szaporodni. A hűtés lassítja szaporodását, túlélését viszont támogatja a savas kémhatású élelmiszerekben. Kutatások igazolták például a túlélését kemény szalámban (pH 4,4) hűtve tárolás alatt. Annál nagyobb a gátlás, minél kisebb a pH és a hőmérséklet (Johnson et al., 1998). A fermentált élelmiszereknek az alacsony pH az egyik legfőbb biztonsági és minőségi tulajdonsága. Tanulmányok szerint a *Listeria monocytogenes* képes a túlélésre narancslében pH 3,6 4 °C hőmérsékleten 1-4 napig (Paris és Higgins, 1989), valamint 200 illetve 365 napig a cheddar sajtban pH 5,1 13 °C és 6 °C hőmérsékleten tárolva (Ryser és Marth, 1988/B).

2.3.4 NaCl

A magas sókoncentráció gátolja a baktériumok szaporodását az élelmiszer vízaktivitásának csökkentésével. A *Listeria monocytogenes* jelenlétét 259 napig ki tudták mutatni a sajtgyártáshoz használt sós páclében (23,8% NaCl, pH 4,9, hőmérséklet 4°C. Ez azt bizonyítja, hogy a *Listeria monocytogenes* magas sókoncentrációt is képes elviselni, és a páclé az élelmiszeriparban nem véd meg tőle (Larson et al., 1999). A 6, 16 és 26%-os NaCl koncentrációk hatását vizsgálták a *Listeria monocytogenes* túlélésére, alacsony hőmérsékleten (10°C hűtési hőmérsékleten és 2°C körül), valamint fagyasztott -18°C-os környezetben. Minden vizsgált sókoncentráció hatástalannak bizonyult a patogén sejtszámának csökkentésére az alacsony hőmérsékletű 6 órás tárolási idő alatt. Hosszabb időn keresztül, 33 napon át azt tapasztalták, hogy a patogén sejtszáma a 6%-os NaCl koncentráció mellett nőtt, nem változott a 16%-os NaCl tartalom esetén, míg a 26%-os NaCl koncentrációban hanyatlásnak indult 0-4°C hőmérséklet tartományban (Hudson, 1992).

2.3.5 Nizin

A nizin tartósítószerként történő alkalmazását számos országban és földrészen, mint például USA-ban, Ausztráliában, Dél-Afrikában, Oroszországban, Indiában engedélyezték az élelmiszeriparban. A nizin (E234) polipeptidekből álló csoport, amelyet 34 aminosav alkot (EFSA, 2006). Kémiai felépítése szerint a nizin a lantibiotikumok csoportjába tartozik, amelyek kis méretű, lantionint és β -metillantionint tartalmazó bakteriocinek (Deák, 2006). A *Lactococcus lactis subspecies lactis* bizonyos törzsei termelik. Előállítására a genetikailag módosított baktériumok alkalmazása is lehetséges. A tartósítószer tevékenysége elsősorban a Gram-pozitív baktériumok spóráira és vegetatív sejtjeire hat. Egyéb tartósítási módszer hiányában a nizin nem gátolja a Gram-negatív baktériumokat, penészeket és az élesztőket. Azért, mert számára a Gram-negatív baktériumok külső membránja áthatolhatatlan. Gyakran kombinációban használják, kölcsönösen egymást megerősítő tartósítási módszerekkel, mint például alacsony pH vagy magas só koncentráció.

A bakteriocinek sokban különböznek az antibiotikumoktól: szintézisükben, mérgező hatásukban, ellenálló képességükben. Sok tejsavbaktérium van tejipari és húsipari termékekben, amelyek különféle bakteriocint termelnek. A nizin jelenlétéből arra következtethetünk, hogy tejsavbaktériumok is jelen vannak az élelmiszerekben, melyekhez közvetlenül adják hozzá őket vagy pedig starterkultúráként kerülnek bele. A szervezetünkbe bevitt élelmiszerek nizin tartalma nem veszélyes az egészségünkre, mivel a tripszin (fehérjebontó enzim) és a pankreatin (hasnyálmirigyből kivont vegyület) hatástalanítják, gyorsan és teljes mértékben lebontják. A bél mikroflórájára így nincsen hatással. Semmiféle utalás nincs arra, hogy a nizin élelmiszer-adalékként való alkalmazása a terápiás jelleggel használt antibiotikumoknak ellenálló mikroorganizmusok kialakulását segítené. A nizinnek kettős mikrobaölő tulajdonsága van, gátolja az elektrontranszportban az oxigén felvételét, így a megtámadott sejt nem tudja a szintéziséhez szükséges energiát előállítani, valamint a citoplazma membránban pórusokat képez, amelyen keresztül a kismolekulájú anyagok kiáramlanak a sejtből. Hatásspektruma szűk. Hőtűrő anyagként hat a veszélyes klosztridiumokra és számos baktérium ellen, amelyek a sajtgyártás során nemkívánatos aromákat hozhatnak létre. A nizin ezért főképp a hőre érzékeny tejtermékekben való felhasználásra alkalmas.

Jelenleg a nizin csak az élelmiszerek tartósításában használják, gyógyászati célokra nem alkalmazzák (EFSA, 2006). Főként a tejtermékekben a *Clostridium botulinum*, sajtokban a kései puffadást okozó *Clostridium butyricum* és a *Clostridium tyrobutyricum* spórák gátlására alkalmazzák. Mindazonáltal konzervipari termékekben is felhasználják a klosztridiumok inaktiválására 4,5-nél nagyobb pH-jú és kis savtartalmú környezetben. Pasztörözött sonka, zöldségkonzervek, kolbászok, spagetti- és makarónikonzervek előállításánál is igénybe veszik (Deák, 2006). A nizin kizárólag a következő felhasználásokra engedélyezett: ömlesztett sajtok és

érlelt sajtok (max. 12,5 mg/kg), búzadara- és tápiókapuding (max. 3 mg/kg), tejföl (max. 3 mg/kg), mascarpone (max. 3 mg/kg). Elfogadható napi beviteli mennyisége, pedig 0,13 mg/kg (EFSA, 2006).

2.4 Gát technológia

A gát technológia egy kombinált tartósítási módszer, amelyet Lothar Leistner vezetett be az 1980-as években.



2. ábra Öt akadály, amelyet az élelmiszer tartósításban használunk
(Forrás: Leistner és Gorris, 1995)

F: nagy hőmérséklet, t: hűtés, a_w : vízaktivitás, pH: savasság, Eh: redoxpotenciál, pres.: tartósítószer

A gát elv szerint ahhoz, hogy a mikroorganizmusok egy termékben életben maradjanak vagy elszaporodjanak, több tartósító tényező akadályán kell átjutniuk. Két vagy több ökológiai tényezőt lehet kombinálni, annak érdekében, hogy jobb minőséget érjünk el az élelmiszerek tartósításában. Ezek a tényezők önmagukban nem vezetnek a mikroba gátlásához, de kisebb dózisokban, együttesen alkalmazva elegendőek. Hatásukkal gyakran egymást erősítik, szinergens módon érvényesülnek. A módszerek kombinálásával új tartósító eljárásokat és új termékeket lehet létrehozni (Deák, 2006).

Az **2. ábrán** láthatóak az élelmiszerek tartósításában a leggyakrabban előforduló gátak, mint például a hőmérséklet (magas vagy alacsony), vízaktivitás (a_w) savasság (pH), redoxpotenciál (Eh), tartósítószer (nitrit, szulfít) és az egymással versengő mikroorganizmusok. Mindazonáltal több mint 60 potenciális gátja van az élelmiszerekben található mikroorganizmusoknak. Ezek javíthatják a termékek stabilitását és/vagy a minőségét, ugyanakkor intenzitásuktól függően lehetnek pozitív, illetve negatív hatással is az élelmiszerekre. Például a fermentált kolbász pH-ja, amelynek elég alacsonynak kell lennie a patogén gátlására, de nem szabad olyan alacsonynak lennie, hogy rontsa a termék ízét. Az akadály technológia során a gátakat az élelmiszerek optimális tartományában tudják tartani. A cél az, hogy ezeknek a gátaknak egy megfelelő kombinációját alkalmazva, javítani tudjuk az élelmiszerek mikrobákkal szembeni stabilitását, érzékszervi minőségét, valamint a táplálkozási és gazdasági tulajdonságait (Lothar, 2000).

3 A MUNKA CÉLJA

A kutatómunkám célja a *Listeria monocytogenes* törzsek túlélési-alkalmazkodási képességének vizsgálata 37°C hőmérsékleten, különböző pH, NaCl és nizin összetételű modell oldatokban a kórokozó gátlására, tejipari termékek biztonságosságának növelésére.

A vizsgálatok során elsődleges cél a három stressztényező együttes hatásának, szaporodást gátló koncentrációinak megállapítása határfelületi módszer alkalmazásával.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált *Listeria monocytogenes* törzsek

A munkámban három *Listeria monocytogenes* törzset használtam. Ebből egy törzs a törzsgyűjteményből származik és kettő a tejipari izolátum.

- *Listeria monocytogenes* CCM 7202 (törzsgyűjteményi), jelölése C3
- *Listeria monocytogenes* (tejipari izolátum), jelölése L4
- *Listeria monocytogenes* (tejipari izolátum), jelölése P13

4.2 Tápközegek

Hígító folyadék:

- | | |
|-------------------|---------|
| • NaCl | 8,5g |
| • Pepton | 1g |
| • Desztillált víz | 1000 ml |

BH agar (Brain Heart Agar):

- | | |
|-----------------------------|---------|
| • Brain Heart Broth (Merck) | 37g |
| • Agar-agar (Merck) | 15g |
| • Desztillált víz | 1000 ml |

CASO agar (Casein-peptone Soymeal-peptone Agar) - Tryptic Soy Agar:

- | | |
|------------------------------------|---------|
| • Tryptic Soy (CASO) Broth (Merck) | 30g |
| • Agar-agar | 15g |
| • Desztillált víz | 1000 ml |

4.3 Vegyszerek

- NaCl: Merck (1.06404.1000)
- Nizin por: (Sigma-Aldrich), $C_{143}H_{228}O_{37}N_{42}S_7$, Összetétele: Nizin – 25%, NaCl – 77,5%, Protein – 12%, szénhidrát – 6%, nedvességtartalom – 2%

4.4 A kísérlet leírása

A kísérletek során a tenyésztést mikrotitráló lemezen végeztem. A tenyésztéshez különböző pH-jú NaCl és nizin tartalmú BH tápleveseket állítottam össze a **3. táblázat** szerint.

A vizsgálathoz egy törzsgyűjteményi (*Listeria monocytogenes* CCM7202) és két sajtból nyert tejipari izolátumot (*Listeria monocytogenes* L4 és *Listeria monocytogenes* P13) használtam fel.

3. táblázat: A különböző pH-jú, NaCl és nizin összetételű BH oldatok kombinációi

BH leves jelölése	pH		
		NaCl (%)	Nizin (U)
1	5	5	30
2	5	5	90
3	5	9	30
4	5	9	90
5	8	5	30
6	8	5	90
7	8	9	30
8	8	9	90
9	3,97	7	60
10	9,02	7	60
11	6,5	3,63	60
12	6,5	10,36	60
13	6,5	7	9,54
14	6,5	7	110,45
15	6,5	7	60
16	6,5	7	60



3. ábra Multiskan Ascent 96 Plate Reader

(Forrás: <http://www.google.hu/imgres>)

A felhasznált *Listeria monocytogenes* törzseket BH ferde agaron 24 óráig 37 °C-on tenyésztettem. Ezt követően steril desztillál vízzel mostam le a BH ferde agar felületéről.

A lemosott tenyészetből 10^4 sejt/ml-es koncentrációjú szuszpenziót készítettem, majd ebből 30 μ l-t pipettáztam a különböző pH-NaCl-nizin tartalmú tápleveseket (270 μ l) tartalmazó mikrotiter lemez celláiba. Az eltérő összetételű tápleveseket 3-3 párhuzamosban, random elrendezésben mértem az ELISA mikrotiter lemez celláiba. A *Listeria monocytogenes* szuszpenziók tényleges sejtkoncentrációjának a visszaellenőrzésére szélesztést végeztem CASO agaron (24 órás inkubálás, 37 °C-on). A szaporodás detektálása automata optikai denzitás mérő berendezéssel történt (Multiskan Ascent 96 Plate Reader) 37°C-on való 24 órás inkubáció során (**3. ábra**). A készülék előre beállított program alapján az OD értékeket másfél óránként, a lemezek előzetes rázatása után mérte meg. A törzsek szaporodási görbéinek az elkészítése az OD értékek segítségével történt. A statisztikai értékelést Statistica 9.0 for Windows szoftverrel végeztem.

4.5 Kísérlettervezés

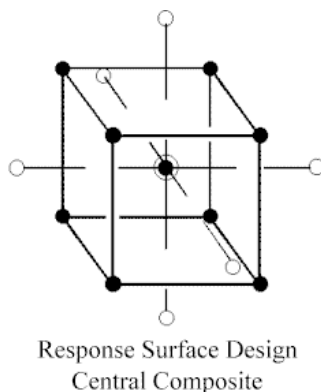
A kísérlettervezésnek két módszertana vált ismertté. Az *optimális kísérlettervezés*hez minden rendelkezésre álló szakismeretet fel kell használni az objektumról a hatékony tervezés érdekében. Ezeket az előzetes ismereteket priori információknak nevezzük. Az *optimalizáló kísérlettervezés*nél lineáris és másodfokú függvények alkalmazásával az optimális működés tartományát jellemző független változó-értékeket keresünk. Az objektum teljes megismerésére és az ok-okozati összefüggések teljes vizsgálatára nem törekszünk az optimalizáló kísérlettervezés során.

A 2^p típusú faktoriális kísérlettervekben úgynevezett független változók, azaz faktorok és egy vagy több függő változó kombinációja szerepel. Faktorszinteknek nevezzük a független változók beállítandó értékeit (Kemény, 1985). Központi kompozíciós tervet alkalmazunk több faktor esetén. Ezeknek az alapja egy 2^p típusú teljes faktoriális kísérleti terv. A koordinátatengelyeken 2^p ún. csillagpontok és k_c centrumbeli kísérlet találhatóak. A csillagpontok α távolságra vannak a centrumtól. Az α értékek befolyásolják a terv ortogonalitását és a forgathatóságát (Kemény et al., 2004).

A kísérletek megfelelő elkészítéséhez szükség van randomizálásra. A randomizálás alatt a kísérletek sorrendjének véletlenszerű ismétlését értjük. A kísérleti tervek készítésekor azt feltételezzük, hogy a célfüggvényt csak a vizsgált faktorok befolyásolják és az összes többi tényezőnek nincs jelentős hatása. A vizsgált faktorokénál kisebb hatású tényezők egy része ismeretlen, hatásuk az idővel változik, ha azonos irányba változnak az idővel, akkor a faktor hatása az időben változó tényezők hatásától nem különíthető el, ezért szükséges a randomizálás (Kemény, 1985).

A válaszfelület módszere

A hatásfelületi analízis egy tapasztalati modellezési eljárás, amely előre jelzi a kísérleti faktorok és a kapott eredmények közötti kapcsolatot. Mostanában ez az egyik legközkedveltebb optimalizációs technika az élelmiszer tudomány területén azért, mert egyszerűen alkalmazható, átfogó elmélettel és magas hatásfokkal rendelkezik.



4. ábra Központi Elrendezésű Kísérletterv

Forrás: <http://www.jgna.com/doe2.gif>

A legegyszerűbb kísérleti terv típus, amit használnak a hatásfelületi módszerben, az a **4. ábrán** látható Központi Elrendezésű Kísérletterv (CCD - Central Composite Design).

A kísérletek pontjainak a száma elegendő a felállított modell érvényességének és hiányosságainak statisztikai elemzésére. A Központi Elrendezésű Kísérlettervben a középpontot többször ismétlik, hogy megbecsüljék az eltérést és megkapják a kísérleti és véletlenszerű szórást. Az összes próbát elvégzik a véletlenszerű elrendezésben azért, hogy kizárják a környezeti tényezők zavaró hatását.

Ha a vizsgálatban 3 független tényezőt használtak a Központi Elrendezésű Kísérlettervben, a regressziós modell megmutatja, hogy a 3 független tényező és a kiválasztott kombinációk, milyen hatást fejtenek ki az optimalizációs paraméterrel és ezáltal minimalizálni tudják az elvégezendő kísérletek számát.

A változók kódolt értéket vesznek fel, melyet a következő egyenlettel határozzunk meg:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X,$$

ahol x_i : a változó kódolt értéke, X_i : valós érték, X_0 : középpont valós értéke, ΔX : lépéstávolság, azaz variancia intervallum.

A rendszer viselkedése a következő másodfokú polinom egyenlettel leírható:

$$Y = B_0 + \sum B_i x_i + \sum B_{ij} x_i x_j + \sum B_{ij} x_j^2$$

Ahol:

Y = előre jelzett válasz

n = értékek száma

B_0 = konstans

x_i, x_j = bemeneti, kódolt független változók

B_i, B_{ij}, B_{jj} = lineáris tényező (Yu-Long Gao et al., 2007).

Az illesztett polinom egyenlet segítségével lehet kifejezni a felületet és a görbék kontúrvonalát azért, hogy szemléltesse a kapcsolatot a felület és minden faktor kísérleti szintjei között. Ezáltal következtetni tudunk az optimális feltételekre.

Esetemben az optimalizációs kísérletekkel ellentétben azokat a felületeket/kombinációkat kerestem, amelyek gátolják a *Listeria monocytogenes* szaporodását.

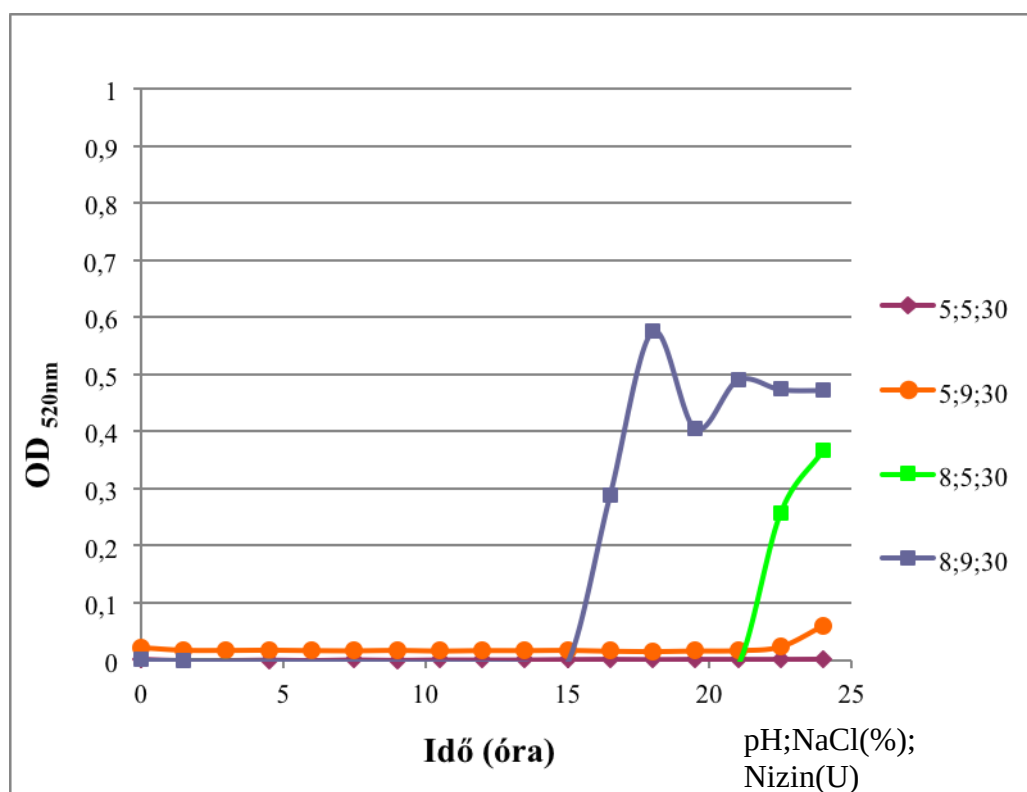
A variancia-analízis szerint a hatás és a különálló egyenes regressziós együtthatóját a másodfokú egyenlet és a feltételek kölcsönhatása határozza meg. A regressziós koefficienszt statisztikai számításra használjuk azért, hogy létrehozzunk, ezáltal egy térbeli leképezést a regressziós modellről. Ha a p érték kisebb 0,05-nél, akkor statisztikailag szignifikánsnak tekinthetők az eredmények (Yin et al., 2011).

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

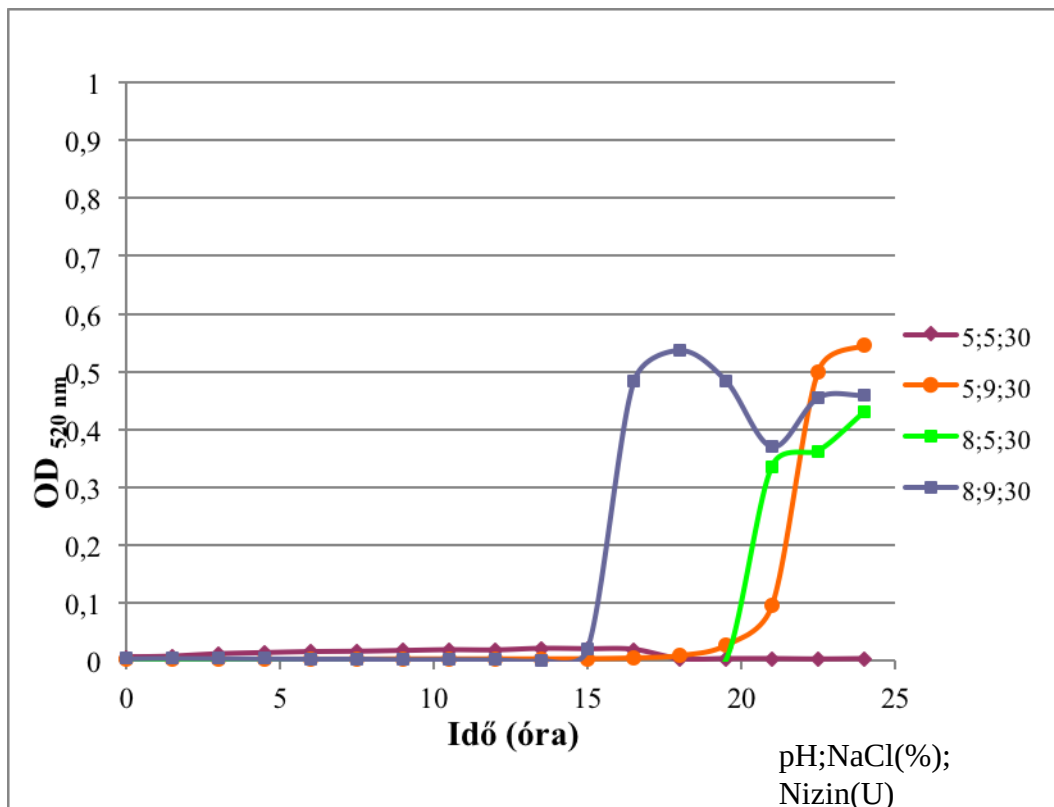
5.1 Baktérium szaporodása

A Multiscan Ascent berendezés segítségével kapott OD értékek alapján vettem fel a három törzs szaporodási görbéit. A mérés kezdetétől fogva a készülék másfél óránként mérte az OD értékeket. A 24 órás mérés után a kapott OD értékeket az idő függvényében ábrázoltam (5. - 10. ábrák).

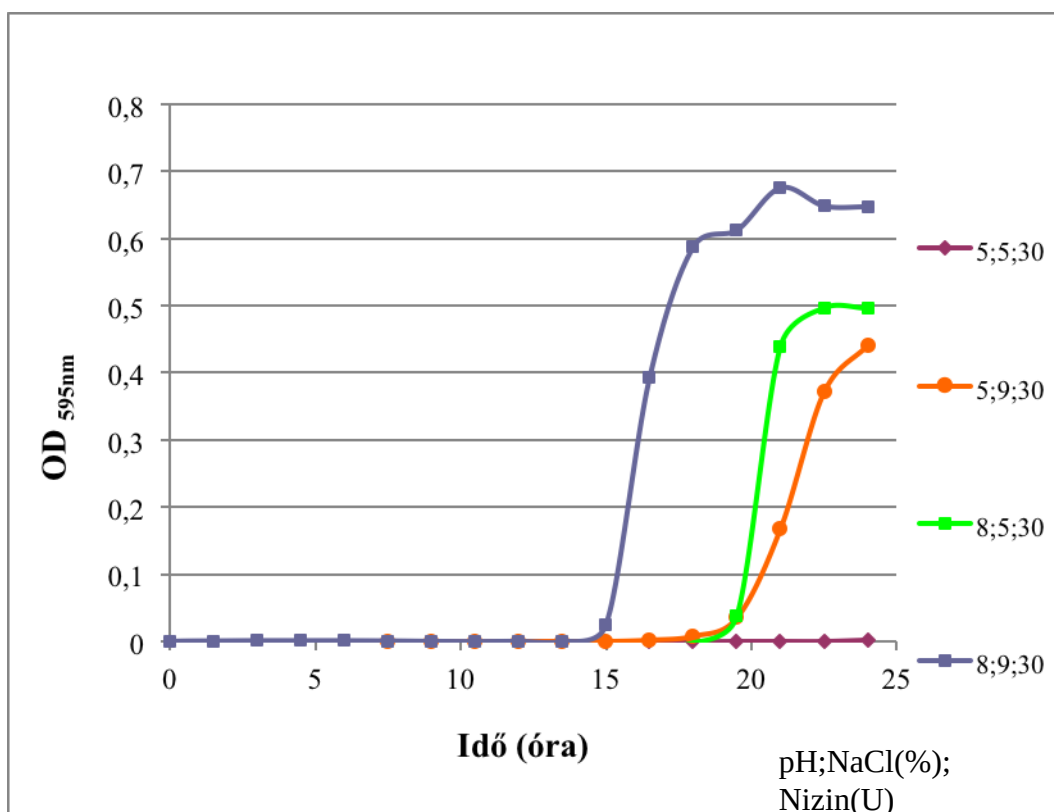
Látható, hogy minden kísérleti beállításnál 14 óráig tartott a lag-szakasz, hiszen az OD értékek eddig az időpontig nem növekedtek.



5. ábra A *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs szaporodási görbéi 30 U nizin tartalmú táplevesben



6. ábra A *Listeria monocytogenes* L4 törzs szaporodási görbéi 30 U nizin tartalmú táplevesben



7. ábra A *Listeria monocytogenes* P13 törzs szaporodási görbéi 30 U nizin tartalmú táplevesben

A 5. ábrán látható törzsgyűjteményi *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs a 15-dik órában kezdte meg a szaporodását a pH 8 - 9%-os NaCl tartalmú levesben, majd a 21. óra környékén a pH 8 - 5% NaCl tartalmú kombinációkban. Végül a 22-dik órában a pH 5 – 9% NaCl tartalmú levesben

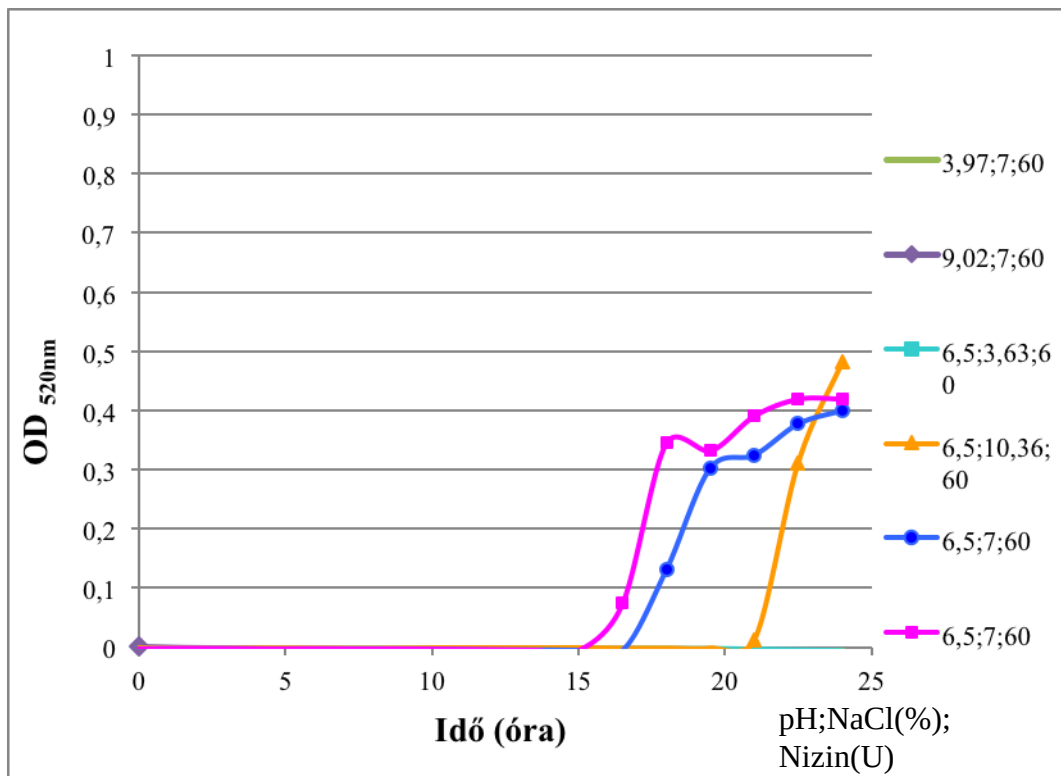
is megkezdődött a *Listeria monocytogenes* szaporodása. A törzsgyűjteményi törzsnél a pH 8 – 5% NaCl tartalmú kombinációnál 2-3 órával később, a pH 5 – 9% NaCl összetételű levesben pedig 4-5 órával később indult meg a szaporodás a tejipari izolátumokhoz képest. Ebből az látszik, hogy a törzsgyűjteményi törzs sejtei lassabban alkalmazkodnak a kísérleti körülményekhez, mint a tejipari izolátumok.

Az L4 jelű törzs - szaporodási görbéit a **6. ábra** mutatja - és P13 sajtból nyert tejipari izolátumok ugyanolyan tartalmú kombinációknál, szinte azonos órában kezdték meg a szaporodást. A pH 8 – 9% NaCl tartalmú keveréknél a kísérlet 15-dik órájában, a 18-dik órájában pH 5 – 9% NaCl és a 19. órájában pH 8 – 5% NaCl összetételű oldatban kezdődött a növekedés. Az elvégzett kísérletek alapján a legnagyobb mértékű szaporodást a P13-as jelű *Listeria monocytogenes* mutatta, amelynek a görbéit a **7. ábra** tartalmazza.

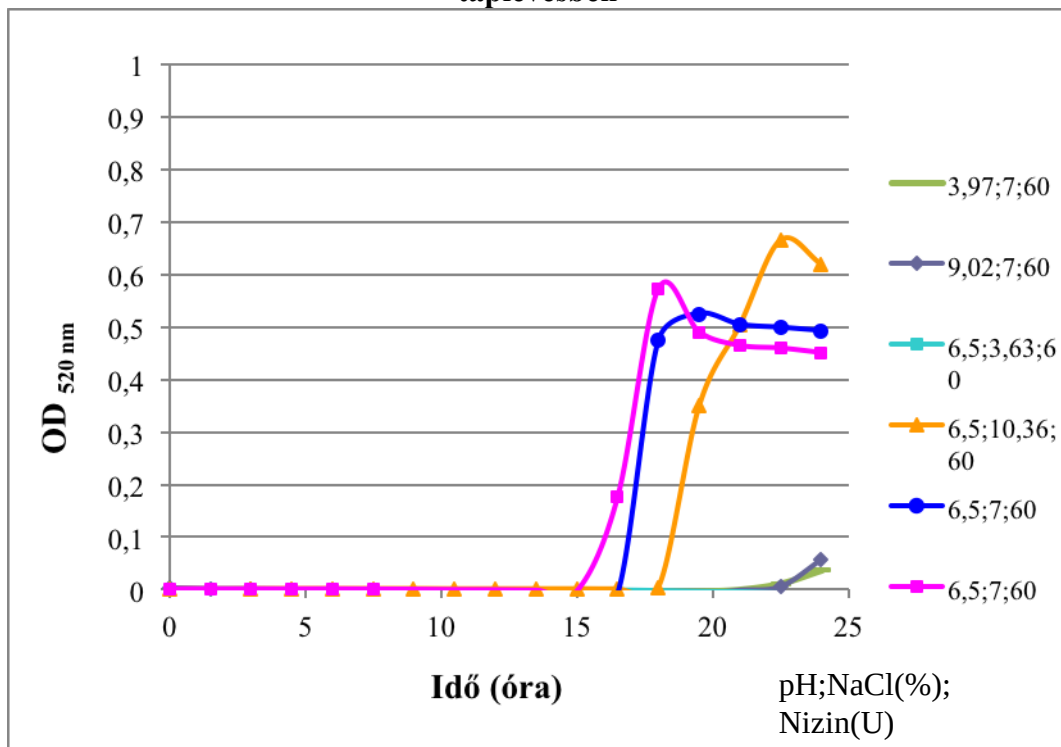
A 30 U tartalmú táplevesben a legnagyobb ellenálló képességgel a P13 törzs rendelkezik, amelynek szaporodása a 15. órában a pH 8 - 9% NaCl, 18. órában a pH 5 – 9% NaCl, 19. órában pedig a pH 8 – 5% NaCl összetételű oldatokban is megindult. A többféle alkalmazott kombinációkban és az összes vizsgált törzsek közül a P13 érte el a legmagasabb 0,68 OD értéket pH 8 – 9% NaCl és 30 U nizin tartalmú táplevesben a szaporodási görbéjének exponenciális szakaszában. Mind a három törzsnél optimális szaporodási hőmérsékleten, 24 óra alatt sem történt szaporodás a pH 5 – 5% NaCl tartalmú kombinációnál.

A 60 U nizin tartalmú levesekben hat féle kombináción tanulmányoztam az adott törzsek szaporodását. A három törzsnél a lappangási szakasz itt is 14 óráig tartott, a szaporodás a 15-dik órától kezdődött.

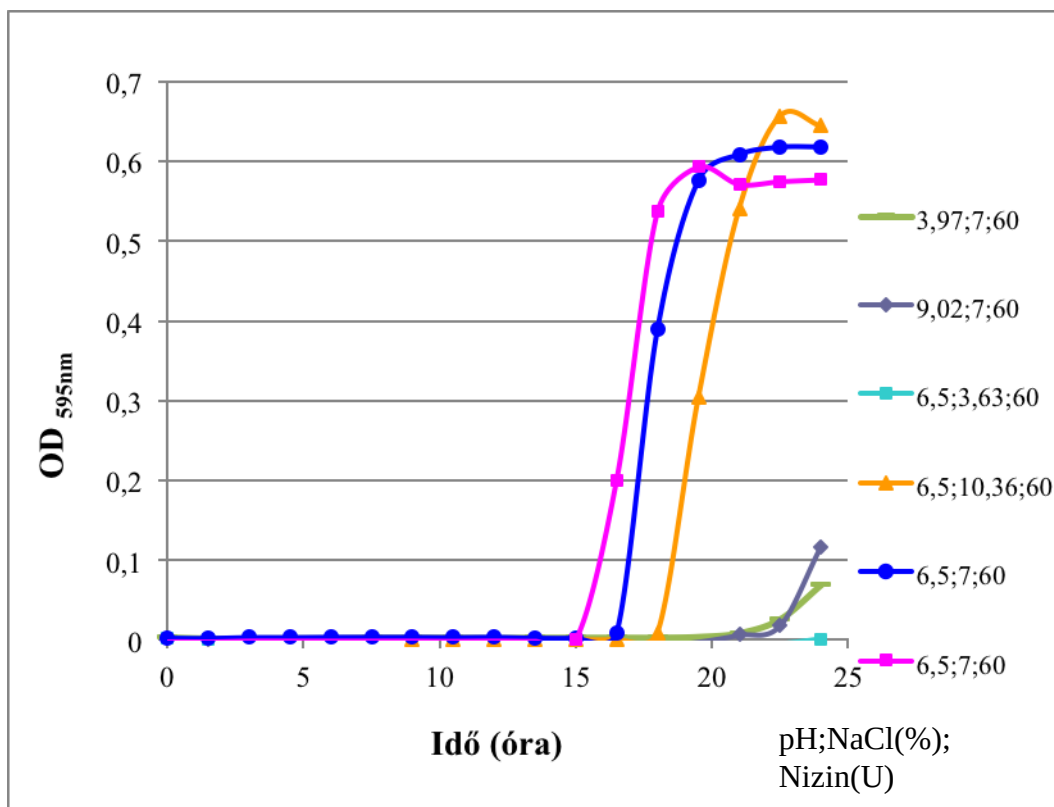
Megfigyelhetjük, hogy a törzsgyűjteményi törzs esetén az optikai denzitás érték a 15. és a 16. óra környékén a pH 6,5 – 7% NaCl tartalmazó oldatban és 21. órában a pH 6,5 – 10,36% NaCl összetételű oldatban kezdett el növekedni (**8. ábra**). A két tejipari izolátumhoz képest gyengébben szaporodott az adott kísérleti környezetben, sőt a pH 3,97 – 7% NaCl, a pH 9,02 – 7% NaCl és a pH 6,5 – 3,63% NaCl feltételek mellett nem is volt képes 24 óra alatt a szaporodásra 60 U nizin tartalmazó táplevesekben.



8. ábra A *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs szaporodási görbéi 60 U nizin tartalmú táplevesben



9. ábra A *Listeria monocytogenes* L4 törzs szaporodási görbéi 60 U nizin tartalmú táplevesben



10. ábra A *Listeria monocytogenes* P13 törzs szaporodási görbéi 60 U nizin tartalmú táplevesben

Az L4 törzs szaporodása a kísérlet 15. és 16. órájában a pH 6,5 – 7% NaCl összetételű levesekben, a 17. óra környékén pedig a legnagyobb mértékben a pH 6,5 – 10,36% NaCl összetételű oldatban indult meg, amelyet a **9. ábra** mutat. Ezen kívül a pH 9,02 – 7% NaCl és a pH 3,97 – 7% NaCl tulajdonságú táplevesben csak a kísérlet vége felé kezdte meg a szaporodást. A tesztmikróba a pH 9,02 – 7% NaCl tartalmú kombinációban a 22-23. óra körül, míg a pH 3,97 – 7% NaCl tartalmú oldatban a 21. órában kezdte meg a szaporodást. A pH 6,53 – 3,63% NaCl kombináció az L4 törzs szaporodását gátolta a mérés egész ideje alatt úgy, mint a törzsgyűjteményi törzs esetében.

A **10. ábrán** a P13 törzsnél mind a hat vizsgált kombinációban tapasztalható volt a szaporodási képesség növekedése. A P13 tejipari izolátum volt a leginkább alkalmazkodó törzs. Még a pH 6,53 – 3,63% NaCl tartalmú levesben is beindult a szaporodása a kísérlet utolsó órájában. A 21. órában a pH 9,02 – 7% NaCl és a pH 3,97 – 7% NaCl tartalmú oldatkombinációkban kezdődött a növekedés, körülbelül két órával korábban, mint az L4 törzsnél. Azonos időpontban indult be a pH 6,5 – 7% NaCl, a pH 6,5 – 10,36% NaCl összetételben az L4 és a P13 törzs által okozott optikai denzitás növekedése.

Az L4 törzs a pH 6,5 – 10,36% NaCl tartalmú levesben elért OD értéke (0,67) magasabb, mint a P13 törzs ugyanilyen oldatkombinációjában.

Ennél az egy kombinációnál fordult elő, hogy az L4 törzs legmagasabb OD értéke túlhaladja a logaritmusos szakaszban a P13 törzs OD értékét, az összes többi szaporodási görbéjénél 60 U nizin

összetételű oldatban. A legalacsonyabb 9,54 U nizin tartalmú levesekben mind a három *Listeria monocytogenes* törzs viselkedése hasonló volt a pH 6,5 – 7% NaCl kombinációnál. A görbék lefutásán közel azonos mértékű szaporodás figyelhető meg, azzal a különbséggel, hogy a törzsgyűjteményi törzs csak a 19,5. órában kezdett el szaporodni, míg a két tejipari izolátum már 1,5 órával előbb. A legmagasabb 110,45 U nizin összetételnél, pH 6,5 – 7% NaCl kombinációjú táplevesben a CCM 7202 törzsgyűjteményi törzsnél és az L4 törzsnél a 18. órában indult be a növekedés, míg a P13 törzs esetében ismét egy korábbi időpontban, a 16,5. órában.

A **M.1. ábráról** elmondható, hogy az alkalmazott legkisebb és legnagyobb nizin tartalmú összetételnél, a pH 6,5 – 7% NaCl tartalom mellett a P13 törzs két szaporodási görbéje szinte egyforma lefutású. A **M.1. ábra** szaporodási görbéi alapján arra következtetnek, hogy a P13 törzs szaporodását a pH 6,5 – 7% NaCl tulajdonságú oldatban a 9,54 U és 110,45 U nizin tartalom nem befolyásolta jelentősen. A **M.2. ábrán** látható, hogy a CCM 7202 törzs a 18. óra környékén indult növekedésnek a pH 8 – 9% NaCl, majd a 19. órában a pH 8 – 5% NaCl összetételben, ezt követően pedig a 20. órában a pH 5 – 9% NaCl tulajdonságú táplevesben 90 U nizin tartalmú kombinációknál. Az L4 törzs esetében a pH 5 – 9% NaCl tartalmú levesben a 16,5. óra körül látható az OD növekedésének a kezdete, majd a 18. órában a pH 8 - 5% NaCl tartalmú környezetben (**M.3. ábra**). Egy különleges esetet figyelhetünk meg, ha a két tejipari törzs szaporodását összehasonlítjuk a pH 8 – 9% NaCl tartalmú oldatban mégpedig, hogy nem a P13 törzs, hanem az L4 törzs kezdte meg a szaporodását előbb, 1 órával, ugyanígy a pH 5 – 5% NaCl összetételnél (**M.3., M.4.**). A 90 U nizin tartalmú táplevesben a pH 5 – 5% NaCl összetételű kombinációnál azt tapasztaljuk, hogy 24 óra alatt sem tud a CCM 7202 törzs szaporodásnak indulni (**M.2.**)

5.2 Kombinált hatás vizsgálata

Az előző kísérletsorozat alapján azt tapasztaltam, hogy pH, NaCl és nizin gyakorolt hatást a *Listeria monocytogenes* sejtsűrűségére. A kombinált hatás feltárására kísérlettervezési módszert alkalmaztam. Gyakorlatban a válaszfelületi módszerek (Response Surface Method, RSM) közül a Központi Elrendezésű Módszert használtam három faktorral. A függő változóként a szaporodás 24 órájában detektált sejtsűrűséget (OD_{595nm}) választottam, amelynek változását polinommal (**1. egyenlet**) közelítettem meg. A modell koefficienseit regressziós analízissel számoltam ki.

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_1^2 + b_3 X_2 + b_4 X_2^2 + b_5 X_3 + b_6 X_3^2 + b_7 X_1X_2 + b_8 X_1X_3 + b_9 X_3X_2 + b_{10} X_1X_2X_3 \quad (1. \text{ egyenlet})$$

Ahol: Y: sejtsűrűség (OD_{600nm}), X_1 : pH, X_2 : NaCl (%), X_3 : nizin, b_i : regressziós koefficiens. A következő fejezetekben törzsenként mutatom be az eredményeket.

5.2.1 *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs

A CCM 7202 törzs esetében a részletes kísérletterv és a kapott eredmények a **4. táblázatban** található. A mért OD_{595nm} értékek három párhuzamos mérésnek az átlagát mutatják.

4. táblázat: Kísérleti terv és a 24. órában mért sejtsűrűség (OD_{595nm})

pH	NaCl (%)	nizin (U)	OD595nm
5	5	30	0,019
5	5	90	0,019
5	9	30	0,078
5	9	90	0,387
8	5	30	0,386
8	5	90	0,054
8	9	30	0,490
8	9	90	0,094
3,977	7	60	0,012
9,023	7	60	0,000
6,5	3,636	60	0,012
6,5	10,364	60	0,499
6,5	7	9,546	0,506
6,5	7	110,454	0,417
6,5	7	60	0,418
6,5	7	60	0,438

Variancia analízissel (ANOVA) ellenőriztem a modell illesztését, amelynek eredménye az **5. táblázatban** található.

5. táblázat: Variancia analízis eredmények

ANOVA; Var.:OD595nm@24h_CCM 7202 R-sqr=,90086; Adj.:,81412 (II) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Pure Error=,0001934 DV: OD595nm@24h_CCM 7202					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH (L)	0,018317	1	0,018317	94,716	0,065185
pH (Q)	0,285981	1	0,285981	1478,787	0,016551
(2)NaCl (L)	0,141731	1	0,141731	732,883	0,023505
NaCl (Q)	0,056918	1	0,056918	294,320	0,037066
(3)Nisin (L)	0,023625	1	0,023625	122,161	0,057442
1L by 3L	0,134421	1	0,134421	695,082	0,024135
2L by 3L	0,007503	1	0,007503	38,798	0,101341
Lack of Fit	0,067884	7	0,009698	50,146	0,108322
Pure Error	0,000193	1	0,000193		
Total SS	0,686696	15			

Megállapítottam, hogy az általam felállított modell - a 'Lack of Fit' p értéke (0,108322) alapján - csupán 90 % valószínűséggel mondható megbízhatónak. Ez az érték biológiai rendszereknél jónak mondható. Ennek alapján megvizsgáltam az egyes faktorok hatását (6. táblázat) a függő változóra, valamint meghatároztam a regressziós koefficienseket (2. egyenlet).

6. táblázat Különböző tényezők hatása a CCM 7202 törzsgyűjteményi törzs szaporodására

Effect Estimates; Var.:OD595nm@24h_CCM 7202R-sqr=,90086; Adj.:,81412 (III) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Pure Error=,0001934 DV: OD595nm@24h_CCM 7202								
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(1)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std Co
Mean/Interc.	0,41877	0,00667	62,758	0,01014	0,33399	0,50356	0,41877	0,0
(1)pH (L)	0,07324	0,00752	9,732	0,06518	-0,02238	0,16887	0,03662	0,0
pH (Q)	-0,31873	0,00828	-38,455	0,01655	-0,42405	-0,21342	-0,15936	0,0
(2)NaCl (L)	0,20374	0,00752	27,071	0,02350	0,10811	0,29937	0,10187	0,0
NaCl (Q)	-0,14219	0,00828	-17,155	0,03706	-0,24751	-0,03688	-0,07109	0,0
(3)Nisin (L)	-0,08318	0,00752	-11,052	0,05744	-0,17881	0,01244	-0,04159	0,0
1L by 3L	-0,25925	0,00983	-26,364	0,02413	-0,38419	-0,13430	-0,12962	0,0
2L by 3L	0,06125	0,00983	6,228	0,10134	-0,06369	0,18619	0,03062	0,0

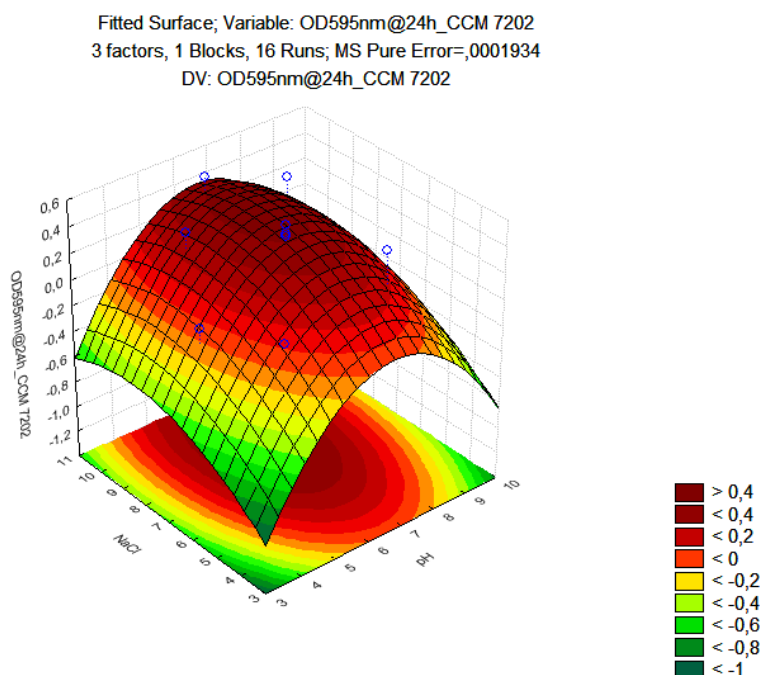
Látható, hogy a pH és a NaCl 95 % valószínűséggel, a nizin 94 % valószínűséggel hat a CCM 7202 törzs szaporodására (6. táblázat). Szintén 90%-os megbízhatósággal elmondható, hogy a pH és nizin, valamint NaCl és nizin kölcsönhatást fejtett ki egymásra az alkalmazott modellben.

Ennek alapján a sejtsűrűség 24 óránál a **2. egyenlettel** írható le:

$$Y = -5,0 + 1,12 X_1 - 0,07 X_1^2 + 0,30 X_2 - 0,02 X_2^2 + 0,02 X_3 - 0,003 X_1 X_3 \text{ (2. egyenlet)}$$

ahol y: OD595nm, X_1 : pH, X_2 : NaCl (%), X_3 : nizin (U).

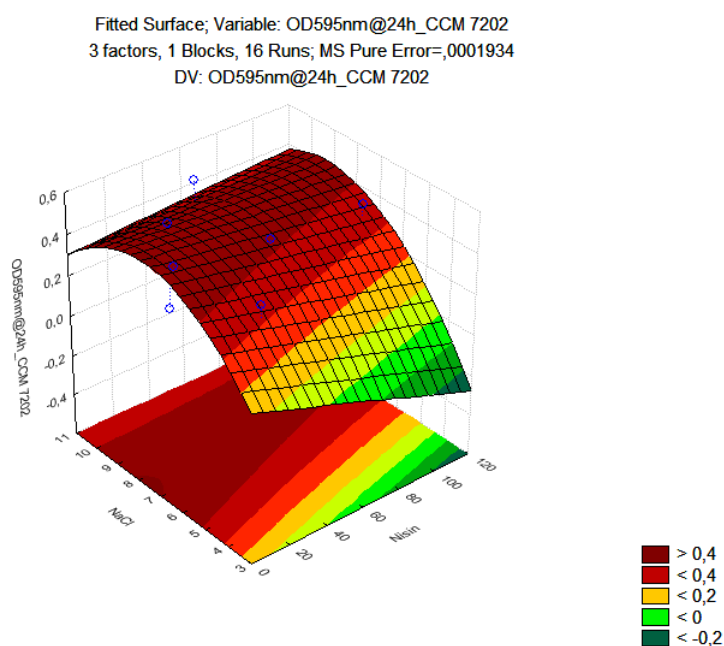
A kapott egyenlet alapján és a program segítségével a **11. és a 12. ábrán** lévő hatásfelületekkel szemléltettem a baktérium várható OD_{595nm} értékét 24 órás inkubáció után az adott faktorok függvényében.



11.ábra OD értékek változása a pH és NaCl koncentráció függvényében

Megállapítható, hogy a pH csökkentése (<4) vagy növelése (>9) jelentősen gátolja a *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs szaporodását. A nizin koncentráció növelése is gátló hatást eredményez, csak az általam vizsgált tartomány nem tűnik elegendő dózissnak.

Az eredmények alapján a következő koncentrációkat tartom megfelelőnek a *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs szaporodásának gátlására: pH=4, NaCl 3%, nizin 60 U. E kombináció alkalmazásával az várható, hogy 24 óra után is közel nullával lesz egyenlő a sejtsűrűség változása, azaz a CCM 7202 törzs nem tud szaporodni.



12. ábra OD értékek változása a nizin és NaCl koncentráció függvényében

5.2.2 Tejipari *Listeria monocytogenes* izolátumok

A kombinált hatás vizsgálataimban a törzsgyűjteményi törzsön kívül két tejipari izolátumot (*Listeria monocytogenes* L4 és P13 törzsek) is bevontam. A kísérletitervet és kapott eredményeket a **7. táblázatban** foglaltam össze.

7. táblázat: Kísérleti terv és a 24. órában mért sejtsűrűség (OD_{595nm})

pH	NaCl (%)	nizin (U)	OD _{595nm}	
			L4	P13
5	5	30	0,013	0,003
5	5	90	0,036	0,057
5	9	30	0,555	0,442
5	9	90	0,161	0,246
8	5	30	0,439	0,497
8	5	90	0,036	0,071
8	9	30	0,469	0,648
8	9	90	0,661	0,218
3,977	7	60	0,046	0,069
9,023	7	60	0,066	0,117
6,5	3,636	60	0,000	0,001
6,5	10,364	60	0,628	0,644
6,5	7	9,546	0,517	0,589
6,5	7	110,454	0,433	0,568
6,5	7	60	0,502	0,618
6,5	7	60	0,461	0,577

Megvizsgáltam a modellt illesztését varianciai analízissel és azt tapasztaltam, hogy néhány hatásnál nagy p érték (nagyobb, mint 0,5) volt tapasztalható. Ennek alapján a modell értékelésénél ezeket a hatásokat figyelmen kívül hagytam. A kapott eredmények a **8. és 9. táblázatokban** találhatóak. Megfigyelhető, hogy mind a két tejipari izolátumnál a só lineáris és pH négyzet hatása 95 % szignifikancia szinten illeszkedik a valósághoz. A P13 törzs esetén a többi hatásnak 90 %-os, az L4 törzsnél pedig a X₁.X₃-nak csupán 70 %-os volt a szignifikancia szintje.

8. táblázat ANOVA eredmények P13 törzs esetén

ANOVA; Var.Abs595nm@24h R-sqr=,87903; Adj.:,79839 (III) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Pure Error=,0008405 DV: Abs595nm@24h					
	SS	df	MS	F	p
(1)pH (L)	0,042908	1	0,042908	51,0506	0,088528
pH (Q)	0,370209	1	0,370209	440,4631	0,030311
(2)NaCl (L)	0,295785	1	0,295785	351,9150	0,033904
NaCl (Q)	0,112882	1	0,112882	134,3034	0,054798
(3)Nisin (L)	0,078184	1	0,078184	93,0206	0,065772
1L by 3L	0,063487	1	0,063487	75,5345	0,072929
Lack of Fit	0,119869	8	0,014984	17,8271	0,181269
Pure Error	0,000840	1	0,000840		
Total SS	0,997863	15			

9. táblázat ANOVA eredmények L4 törzs esetén

ANOVA; Var.:OD595nm@24h_L4 R-sqr=,81014; Adj.:,68356 (II) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Pure Error=,0008542 DV: OD595nm@24h_L4					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH (L)	0,055858	1	0,055858	65,3903	0,078329
pH (Q)	0,239719	1	0,239719	280,6283	0,037958
(2)NaCl (L)	0,414438	1	0,414438	485,1647	0,028883
NaCl (Q)	0,033538	1	0,033538	39,2610	0,100752
(3)Nisin (L)	0,038199	1	0,038199	44,7176	0,094501
1L by 3L	0,003187	1	0,003187	3,7305	0,304141
Lack of Fit	0,175617	8	0,021952	25,6984	0,151459
Pure Error	0,000854	1	0,000854		
Total SS	0,929462	15			

Az ismétlésekből számított szórásnégyzet (Pure error) értéke a L4 törzs esetén 0,000854 és a P13 törzsnél 0,0008405 volt. Ez a szórásnégyzet modelltől függetlenül a véletlen hiba varianciájának becslése, ami ez esetben elég kicsi. Sajnos a Lack of fit p értékei 0,151459 és 0,181269 voltak, ami azt jelenti, hogy az alkalmazott modell nem 95 %, hanem kb. 82-85 % szignifikancia szinten felel meg a valóságnak. Tekintettel a biológiai rendszerben rejlő bizonytalansági tényezőkre, elfogadhatónak tartottam a modellt.

A 10. és a 11. táblázatokban a hatások (Effect), annak szórása, a t-próba és az elsőfajú hiba elkövetések p valószínűsége láthatók.

10. táblázat Különböző tényezők hatása a L4 törzs szaporodására

Effect Estimates; Var.:OD595nm@24h_L4 R-sqr=,81014; Adj.:,68356 (IIka) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Pure Error=,0008542 DV: OD595nm@24h_L4							
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(1)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.
Mean/Interc.	0,47464	0,01402	33,844	0,01880	0,29645	0,65284	0,47464
(1)pH (L)	0,12790	0,01581	8,086	0,07832	-0,07307	0,32888	0,06395
pH (Q)	-0,29182	0,01742	-16,752	0,03795	-0,51316	-0,07047	-0,14591
(2)NaCl (L)	0,34840	0,01581	22,026	0,02888	0,14742	0,54938	0,17420
NaCl (Q)	-0,10915	0,01742	-6,265	0,10075	-0,33049	0,11219	-0,05457
(3)Nisin (L)	-0,10577	0,01581	-6,687	0,09450	-0,30675	0,09520	-0,05288
1L by 3L	0,03991	0,02066	1,931	0,30414	-0,22267	0,30251	0,01995

11. táblázat Különböző tényezők hatása a P13 törzs szaporodására

Effect Estimates, Var.Abs595nm@24hR-sqr=,87903; Adj.: ,79839 (IIka) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Pure Error=,0008405 DV: Abs595nm@24h								
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(1)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std. Co
Mean/Interc.	0,57548	0,01391	41,368	0,01538	0,39872	0,75224	0,57548	0,01
(1)pH (L)	0,11210	0,01569	7,145	0,08852	-0,08725	0,31146	0,05605	0,00
pH (Q)	-0,36265	0,01728	-20,987	0,03031	-0,58221	-0,14309	-0,18132	0,00
(2)NaCl (L)	0,29433	0,01569	18,759	0,03390	0,09497	0,49369	0,14716	0,00
NaCl (Q)	-0,20025	0,01728	-11,588	0,05479	-0,41981	0,01930	-0,10012	0,00
(3)Nisin (L)	-0,15132	0,01569	-9,644	0,06577	-0,35068	0,04803	-0,07566	0,00
1L by 3L	-0,17816	0,02050	-8,691	0,07292	-0,43864	0,08231	-0,08908	0,01

Az ANOVA eredményeknek megfelelően a modell átlaga (mean), a pH négyzetes és a NaCl lineáris hatásának szignifikancia szintje meghaladta a 98%-ot. A többi hatás becslésének megbízhatósága kb 90 % volt.

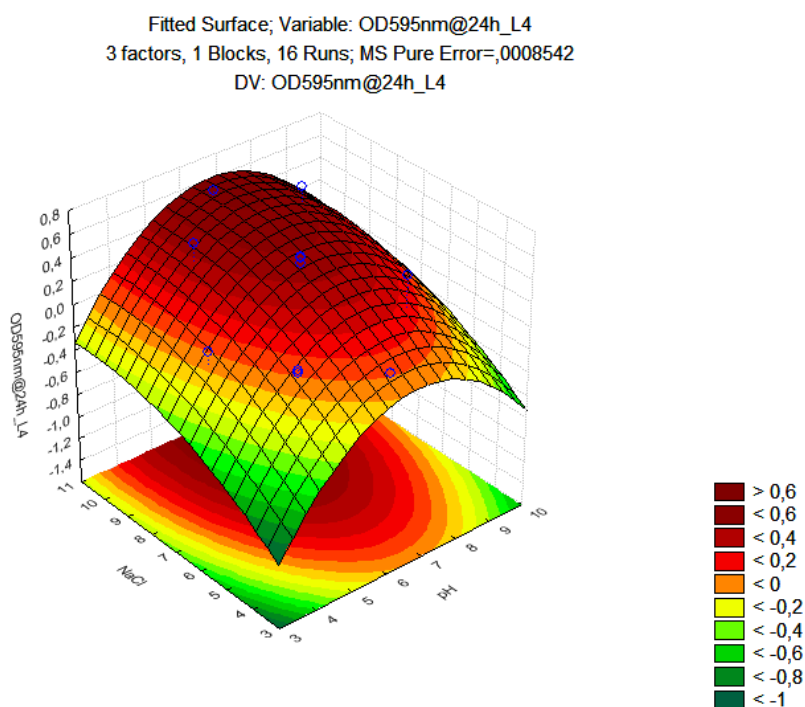
Az egyes konstans (b_i) becslésére regressziós analízist hajtottam végre és a két tejipari izolátum sejtsűrűség változása az alábbi modellel (egyenlettel) írható le:

$$Y_1 = - 3,35 + 0,85 x_1 - 0,06 x_1^2 + 0,25 x_2 - 0,01 x_2^2 - 0,01 x_3$$

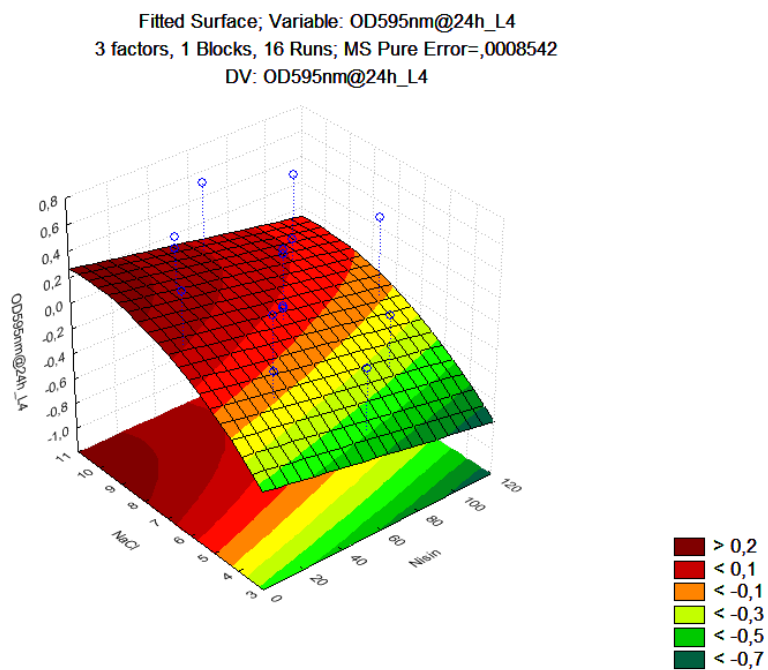
$$Y_2 = - 6,54 + 1,34 x_1 - 0,08 x_1^2 + 0,57 x_2 - 0,03 x_2^2 + 0,01 x_3 - 0,01 x_1 x_2$$

Ahol: Y_1 : L4 törzs OD595nm, Y_2 : P13 törzs OD595nm, x_1 : pH, x_2 : NaCl (%), x_3 : nizin (U).

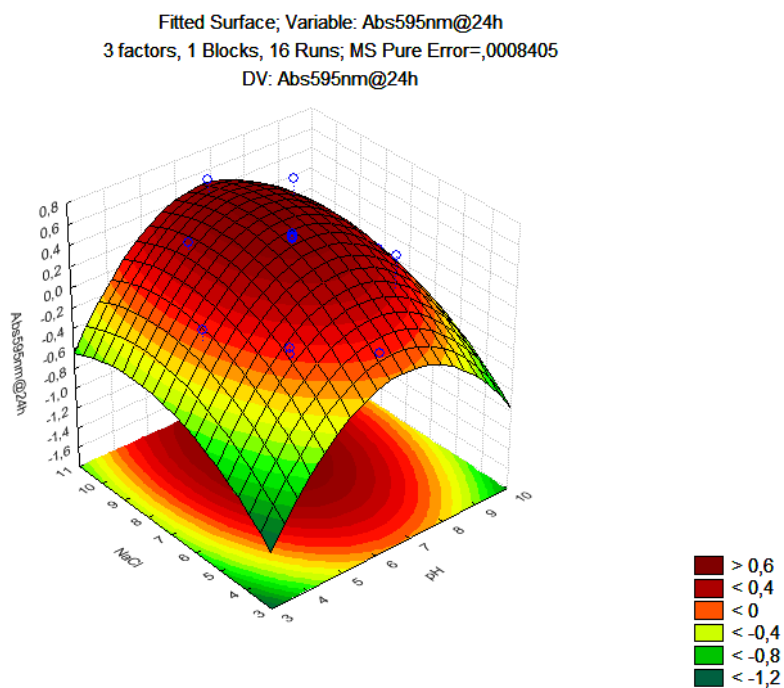
Ennek alapján a **13. - 16. ábrán** szemléltettem az OD értékek változását.



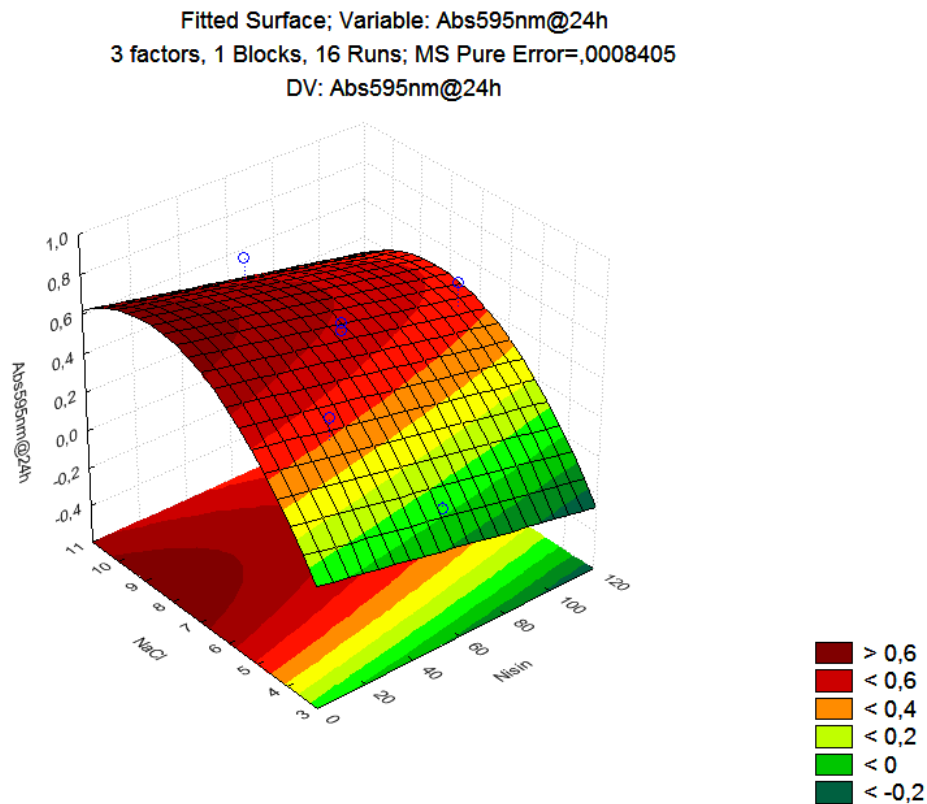
13. ábra Az L4 törzs OD értékeinek változása a pH és NaCl koncentráció függvényében (nizin 60 U)



14. ábra Az L4 törzs OD595nm értékeinek változása a nizin és NaCl koncentráció függvényében (pH=4)



15. ábra Az P13 törzs OD értékeinek változása a pH és NaCl koncentráció függvényében



16. ábra Az P13 törzs OD értékeinek változása a nizin és NaCl koncentráció függvényében

Az OD_{595nm} változását megvizsgálva azt tapasztaltam, hogy sem az L4 törzs sem a P13 törzs nem volt képes szaporodni akár 24 óra időtartamig a 60 U nizin, pH=4 és 3 % NaCl tartalmazó tápközegben. Továbbá a pH és nizin aktivitás változtatásával csökkenthető az alkalmazandó NaCl mennyisége, amely a jelenlegi adagolás szinten számos ér- és szívbetegséget von maga után.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A *Listeria monocytogenes* egy Gram pozitív, patogén baktérium, amely világszerte előfordul és széles körben elterjedt a környezetben. Számos helyen képes megtelepedni, legyen szó akár az emberi, melegvérű emlősállat vagy különböző madárfajok szervezetéről vagy akár élettelen felületekről (fém, üveg, műanyag stb.). Az élelmiszerek is megfelelő táptalajt nyújtanak a mikroba szaporodásához. Az ember számára élelmiszerhigiéniai szempontból szennyezett forrás lehet, például a talaj, a bélsár, vízzel kontaminálódott alap és nyersanyagok, hőkezeletlen tehén-, juh-, kecsketej, juhtúró, lágy sajtok, kolbászok, szalámik, füstölt és sózott hentesárúk. A baktérium szaporodás gátlására eddig is léteznek különböző tartósítási módszerek közöttük a só (NaCl) adagolása vagy pH csökkentése. Azonban kevés tanulmányt találunk a szakirodalomban a különböző stresszhatás együttes alkalmazásának elért hatásáról. A témához kapcsolódva a szakdolgozati munkámban a pH, NaCl és a nizin stressz együttes hatását vizsgáltam a *Listeria monocytogenes* törzsek szaporodására. A vizsgálatokhoz egy törzsgyűjteményi és két, tejipari termékekből származó izolátumot használtam fel. A kiválasztott törzsek szaporodását különböző pH-jú, NaCl és nizin tartalmú BH táplevesekben automata optikai denzitás mérő berendezéssel követtem nyomon.

Az elvégzett kísérletek eredményei alapján megállapítottam, hogy a tejipari izolátumok jobban szaporodtak az adott kísérleti környezetben, azaz kevésbé gátlódtak a vizsgált modell tápközegekben. A három *Listeria monocytogenes* törzs a legalacsonyabb pH=4 és a legmagasabb pH=9 értéknél sem mutatott szaporodást, kivétel a P13 törzsnél, amely pH=9 értéknél a 21-dik órában szaporodásnak indult.

A tejipari termékekből izolált *Listeria monocytogenes* törzsek a 110,45 U nizin mennyiségnél erőteljes szaporodásnak indultak a 18-dik órától.

A CCM 7202 törzs esetén a varianciai analízis (ANOVA) eredményeként megállapítottam, hogy az általam alkalmazott modell 90 % szignifikanciai szinten megfelelt. Tekintettel a biológiai rendszerekben rejlő nagy bizonytalanság miatt, elfogadtam a modellt. Ennek alapján a következő egyenletet javaslom a *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs 24 órában mérhető sejtsűrűség változásának leírására:

$$Y = -5,0 + 1,12 X_1 - 0,07 X_1^2 + 0,30 X_2 - 0,02 X_2^2 + 0,02 X_3 - 0,003 X_1 X_3$$

ahol y: OD595nm, X_1 : pH, X_2 : NaCl (%), X_3 : nizin (U).

Megállapítható, hogy a pH csökkentése (<4) vagy növelése (>9) jelentősen gátolja a *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs szaporodását. Továbbá azt tapasztaltam, hogy a nizin jelenléte enyhén gátló hatást eredményez. Az eredmények alapján a következő dózist tartom megfelelőnek a *L. monocytogenes* CCM 7202 törzs szaporodásának gátlására: pH=4, NaCl 3%, nizin 60 U. E

kombináció alkalmazásával az várható, hogy 24 óra után is közel nullával lesz egyenlő a sejtsűrűség változása, azaz a *Listeria monocytogenes* CCM 7202 törzs nem lesz képes szaporodni 24 óráig.

A P13 és az L4 tejipari izolátumoknál az általam alkalmazott modell adekvája csupán 82-85 % valószínűségi szintjén volt. Ennek ellenére az előbb említett okok miatt elfogadottnak tekintem a modellt és regressziós analízissel határoztam meg a koefficienseket. A kapott eredmények alapján a két tejipari izolátum sejtsűrűség változása az alábbi modellel (egyenlettel) leírható:

$$Y_1 = - 3,35 + 0,85 X_1 - 0,06 X_1^2 + 0,25 X_2 - 0,01 X_2^2 - 0,01 X_3$$

$$Y_2 = - 6,54 + 1,34 X_1 - 0,08 X_1^2 + 0,57 X_2 - 0,03 X_2^2 + 0,01 X_3 - 0,01 X_1 X_2$$

Ahol: Y_1 : L4 törzs OD_{595nm}, Y_2 : P13 törzs OD_{595nm}, X_1 : pH, X_2 : NaCl (%), X_3 : nizin (U)

A modell alkalmazásával, az OD_{595nm} változását megvizsgálva azt tapasztaltam, hogy mind az L4 törzs mind a P13 törzs nem képes szaporodni akár 24 óráig a 60 U nizin, pH=4 és 3 % NaCl tartalmazó tápközegben. Továbbá a pH és nizin aktivitás változtatásával csökkenhető az alkalmazandó NaCl mennyisége, amely a jelenlegi adagolás szinten számos ér- és szívbetegséget von maga után.

Az eredmények alapján összegzésként elmondható, hogy mind a két tejipari izolátum jobban tűri a pH és NaCl változását, mint a törzsgyűjteményi CCM 7202 törzs.

A három faktor kombinált hatásával (pH, NaCl és nizin) megakadályozható a vizsgált törzsek élelmiszerekben való elszaporodása. További vizsgálatokra lenne szükség az egyes faktorok pontos tartományának feltárására.

7 IRODALOMJEGYZÉK

- A BIZOTTSÁG 1441/2007/EK RENDELETE (2007. december 5.) az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól szóló 2073/2005/EK rendelet módosításáról 1. oldal, 4. oldal
- A BIZOTTSÁG 2073/2005/EK RENDELETE (2005. november 15.) az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól, 2. oldal
- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., Salmaso, S., (2000): An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. New England Journal of Medicine 342, 1236–1241.
- Beuchat, L.R. (1996): *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables, Food Control, Vol.7. No 4/5, 223-228.
- Beuchat, L. R. és Brackett R. E. (1990): Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1734-1742.
- Bíró Géza (szerk.) (1999): Élelmiszerhigiénia, Agroinform Kiadó, Budapest, 372.
- Bíró S. (2001): Prokarioták In: Pesti M. (szerk.) Általános mikrobiológia, Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 67-116.
- Carlin, F. and Nguyen-the, C. (1994): Fate of *Listeria monocytogenes* on four types of minimally processed green salads Lett. Microbiol. 18, 222-226.
- Deák, T. (2006): Élelmiszer-mikrobiológia, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 70-71, 36, 171-172.
- EFSA (2006): Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to, The use of nisin (E 234) as a food additive. The EFSA Journal, (2006) 314, 1-16.
- EFSA (2007): Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection – Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Food-borne Outbreaks in the framework of Directive 2003/99/EC and on some other pathogenic microbiological agents for information derived from the reporting year 2006, The EFSA Journal (2007), 100, 1-86.
- Embarek, P.K. (1994): Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review Int. J. Food Microbiol. 23, 17-34.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. (2000): *Listeria monocytogenes*. In: Lund, B'M', Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (ed.) The Microbiological Safety and Quality of Food Vol. II., Aspen Publishers Inc., Gathersburg, Maryland, 1178-1232.
- Gandhi, M., and M. L. Chikindas (2006): *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int. J. Food Microbiol. 113: 1-15.

- Gao Y-L., Ju X-R., Wu-Ding (2007): A predictive model for the influence of food components on survival of *Listeria monocytogenes* LM 54004 under high hydrostatic pressure and mild heat conditions, *International Journal of Food Microbiology* 117 (2007) 287–294.
- Genigeorgis, C., M. Carnicu, D. Dutulescu, és T.B. Farber (1991): Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30 °C. *J. Food Prot.* 54, 662-668.
- Glass, K.A. and Doyle, M.P. (1989): *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1565-1569.
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G. (2010): *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International, Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1280-1288.
- Gray, M.L., and A.H. Killinger.(1966): *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30:309-382.
- Hudson, J. A. (1992): Efficacy of high sodium chloride concentration for the destruction of *Listeria monocytogenes* *Lett. Appl. Microbiol.* 14:178-180.
- Hudson, J. A., S. J. Mott and N. Penney. (1994): Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J. Food Prot.* 57:204-208.
- Johnson, J. L., M. P. Doyle, R. G. Cassens, and J.L. Schoeni. (1998): Fate of *Listeria monocytogenes* tissue of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:497-501.
- Kemény, S. (1985): Kísérletek tervezése és értékelése, Budapest, 136-137, 150-156.
- Kemény, S., Deák, A., Lakné, K. K., Vágó, E. (2004): Statisztikai elemzés a STATISTICA programmal, Műegyetem Kiadó, Budapest, 228.
- Laczay, P. (2008): Élelmiszer-higiéniá, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 50-52, 220-221.
- Lado, B. H. and Yousef, A. E. (2007): Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In E.T. Ryser and E.H. Marth (eds.), *Listeria, listeriosis and food safety*. Marcel Dekker, Inc., New York. (In press).
- Larson, A.E., E.A. Johnson, and J.H. Nelson. (1999): Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *J. Dairy Sci.* 82:1860-1868.
- Lecrecq, A., Clermont, D., Bizet, C. (2010): *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2210-2214.
- Leistner, L., and L. G. M. Gorris (1995): Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology* February 1995 (Vol 6).
- Lennon, D., Lewis, B., Mantell, C., Tonkin, S., Yeates, N., Stamp, R., Mickleson, K., (1984): Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr. Infect. Dis.* 3, 30-34.

- Loncarevic, S., Danielsson-Tham, M.L. and Tham, W., (1995): Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi soft cheeses in retail outlets in Sweden. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 245-250.
- Lothar Leistner (2000): Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology.* 55 (2000), 181–186.
- Miller, A. J. (1992): Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott. A. *AJ. Food Prot.* 55: 414-418.
- Palumbo, S., and A. C. Williams (1991): Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiol.* 8:63-68.
- Paris, M.E., and D.P. Higgins (1989): Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth system. *J. Food Prot* 52:144-147.
- Potel, J. (1952): Zur Granulomatosis infantiseptica . *Zentr. Bakteriell. Parasitenk. Abt. I Orig.* 158:329-331.
- Rocourt, J., Buchrieser, C. (2007): The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes* :Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. In: Ryser, E. T., Mark, E. H., (ed.) *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* Taylor & Francis Group Boca Raton 1-20.
- Rodler, I. (Szerk) (2005): Új tápanyagtáblázat, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 712-713.
- Ryser, E. T., and E. H. Marth (1988/B): Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese. *J. Food Prot.* 50:7-13.
- Ryser, E. T., and E. H. Marth (1988/A): Growth of *Listeria monocytogenes* at different pH values in uncultured whey or whey cultured with *Penicillium camembertii*. *Can. J. Microbiol.* 34: 730–735.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V., (1983): Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 308, 203–206.
- Stratford, M., and P.A. Anslow. (1998): Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic „weak acid preservative”. *Lett. Appl. Microbiol.* 27:203-206.
- Szalka A. Tímár L. Ludwig E. Mészner Zs. (szerk) (2005): *Infektiológia*, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 423.
- Whiting, R.C., and Buchanan, R.L. (1994): Microbial modeling *Food Technol.* 48(6), 113-120.
- Yin, X., You, Q., Jiang, Z. (2011): Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 86 (2011) 1358-1364.
- Young, K.M., P.M. Foegeding (1993): Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. *J. Appl. Bacteriol.* 74:515-520.

URL hivatkozások:

MÉBIH, Magyar Élelmiszerbiztonsági Hivatal, elérhető online:

A :<http://www.mebih.gov.hu/index.php/hu/rasff/kiemelt-rasff-uegyek/456-liszteria-bakterium-sajtokban.html>

B: http://www.mebih.gov.hu/attachments/229_049_5_Q_A_2.pdf

C: <http://www.mebih.gov.hu/index.php/hu/szakmai-rovat/biologiaiveszelyek/229-kanadalisteria.html>

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:7jdf4zq9TIQJ:zeus.nyf.hu/~tkgt/letoltheto/toxinok.doc+v%C3%ADzaktivit%C3%A1s&hl=hu&gl=hu>

Élelmiszerek és takarmányok mikrobiális eredetű károsodása

Vitális instruments and processing systems: Vízaktivitás mérés a mikrobiológiai stabilitás ellenőrzésére: <http://www.vitaliskft.com/docs/vizaktivitasmeres.pdf>

http://www.google.hu/imgres?imgurl=http://www.mtxlsi.com/images/platereaders/multiskan-ascent.jpg&imgrefurl=http://www.mtxlsi.com/multiskan_Ascent.htm&usg=__ER7grzgS63T32a4axZ-ePOIH4MQ=&h=504&w=792&sz=83&hl=hu&start=1&zoom=1&tbnid=qcnNO-wgwEtJmM:&tbnh=91&tbnw=143&ei=yNOxTuG8PIXFtAbh9InSBA&prev=/search%3Fq%3DMultiskan%2BAscent%2B96%2BPlate%2BReader%26um%3D1%26hl%3Dhu%26sa%3DN%26tbn%3Disch&um=1&itbs=1

Listeria monocytogenes pásztázó elektromikroszkópiai képe:

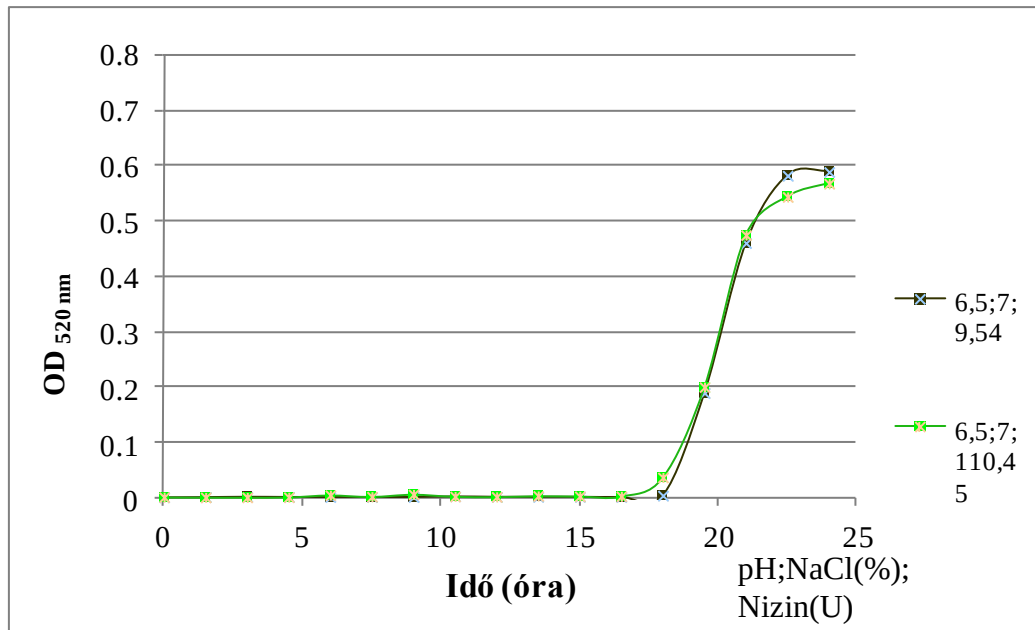
http://hu.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes

Multiskan Ascent 96 Plate Reader: <http://www.google.hu/imgres>

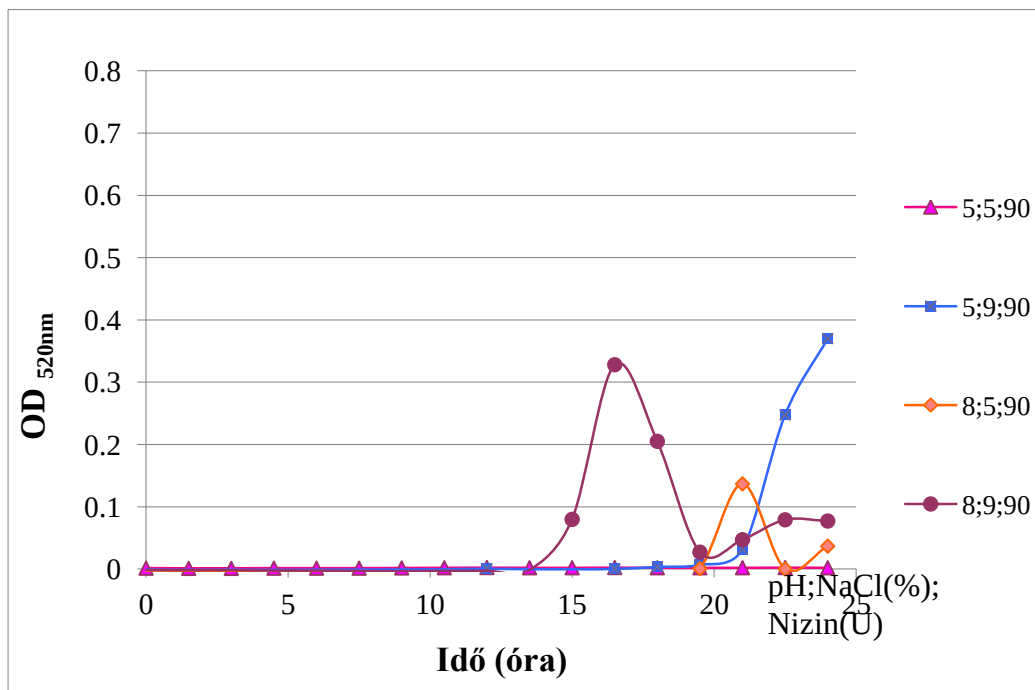
Központi Elrendezésű Kísérletterv: <http://www.jgna.com/doe2.gif>

8 MELLÉKLETEK

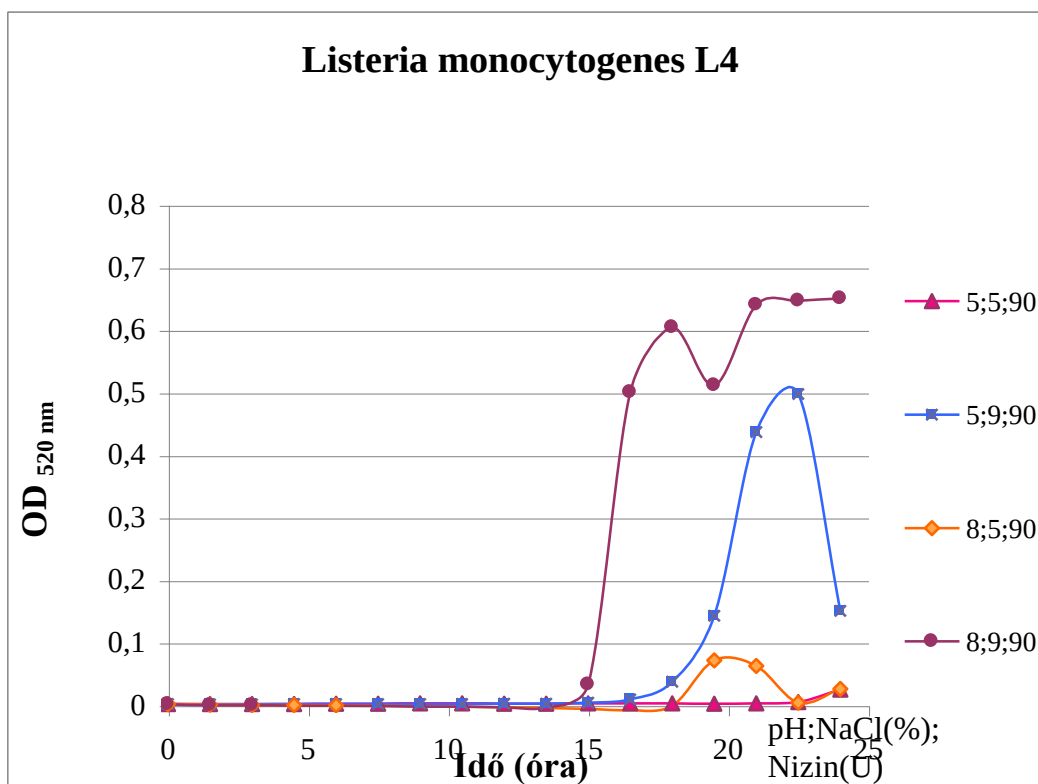
A szaporodási kísérletek eredményei



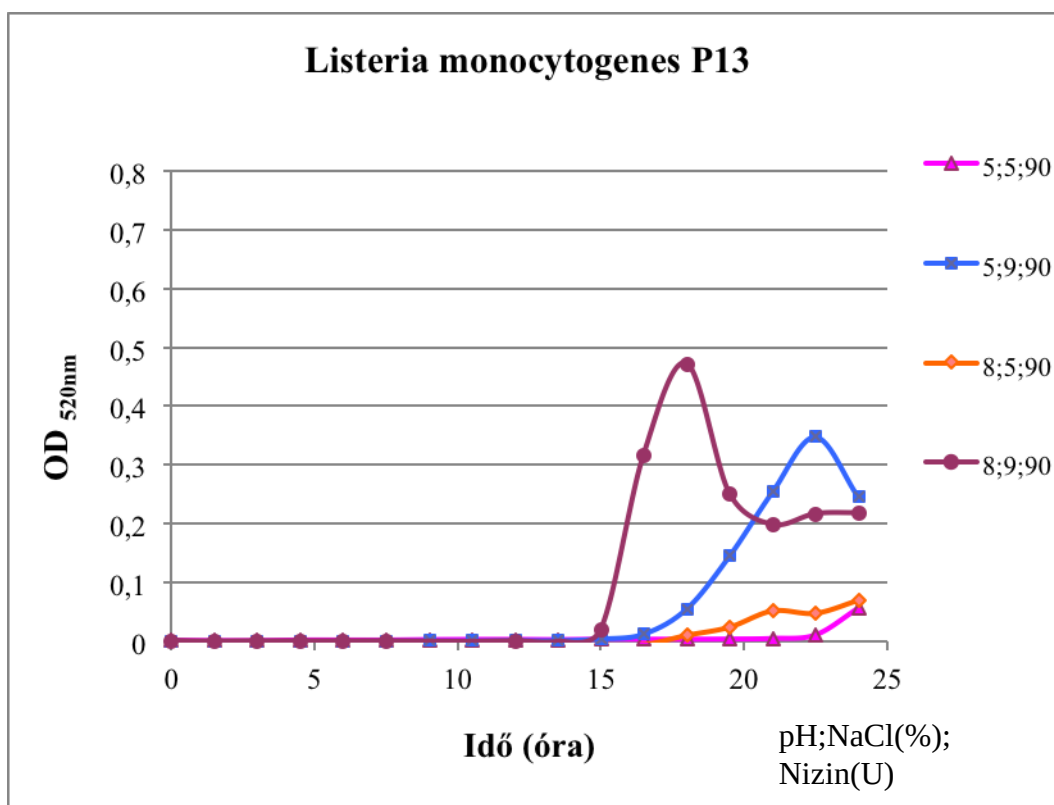
M.1. ábra: A P13 törzs szaporodási görbéi 9,54 U és 110,45 U nizin tartalmú tápvelesekben



M.2. ábra: A CCM 7202 *Listeria monocytogenes* törzsgyűjteményi törzs szaporodási görbéi 90 U nizin tartalmú tápvelesben



M.3. ábra: A L4 törzs szaporodási görbéi 90 U nizin tartalmú táplevesben



M.4. ábra: A P13 törzs szaporodási görbéi 90 U nizin tartalmú táplevesben