



Élelmiszertudományi Kar

Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

***Listeria* fajok szaporodásának detektálása automata redox-
potenciál mérő berendezéssel**

TDK dolgozat

SÁRKÁNY DOROTTYA

Biomérnök 4. évfolyam

Témavezetők: Dr. Kiskó Gabriella

Engelhardt Tekla

Budapest

2013

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A <i>Listeria</i> nemzetség.....	6
2.1.1. <i>Listeria</i> fajokról általában	6
2.1.2. A <i>Listeria monocytogenes</i> faj jellemzői.....	7
2.1.3. A liszteriózis.....	8
2.1.5. <i>Listeria monocytogenes</i> és <i>Listeria innocua</i> kapcsolata	9
2.2. Mikrobiológiai gyorsmódszerek	9
2.2.1. Mikrobiológiai gyorsmódszerek általános áttekintése	9
2.2.2. Hagyományos módszerek gyorsítása és automatizálása	11
2.2.3. Kémiai módszerek.....	12
2.2.3.1. ATP meghatározása.....	12
2.2.4. Fizikai módszerek	12
2.2.4.1. Impedancia és konduktancia változtatáson alapuló módszerek	12
2.2.4.2. Turbidimetria.....	14
2.2.4.3. Flow citometria	14
2.2.5. A redox-potenciál mérési módszer ismertetése.....	14
2.2.5.1. Kifejlesztése	14
2.2.5.2. A redox-potenciál mérőrendszer	15
A módszer felhasználásának példái.....	16
3. Célkitűzés.....	18
4. Anyagok és módszerek.....	19
4.1. A mérés során alkalmazott oldatok	19
4.2. A mérés során alkalmazott mikrobák.....	19
4.3. A mérés során alkalmazott eszközök és berendezések	21
4.4. A mérés menete.....	21
4.4.1. A mérés során alkalmazott módszer ismertetése.....	22
4.4.1.2. Redox-potenciál mérési módszer	22
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	24

5.1. Különböző fajba tartozó mikroorganizmusok redox-potenciál görbéinek összehasonlítása	24
5.2. Nem monocytogenes <i>Listeria</i> fajok redox-potenciál görbéinek összehasonlítása és a <i>Listeria monocytogenes</i> törzsek görbéinek összehasonlítása.....	29
5.2.1. <i>Listeria</i> fajok redox-potenciál görbéinek összehasonlítása.....	29
5.2.2. A <i>Listeria monocytogenes</i> törzsei redox-potenciál görbéinek összehasonlítása.....	33
5.3. <i>Listeria</i> fajok redox-potenciál görbéinek összehasonlítása feles CASO- levesben illetve tejben végzett mérés esetében	36
6. Összefoglalás.....	39
Irodalomjegyzék.....	40

1. Bevezetés

A *Listeria monocytogenes* más patogén baktériumokkal szemben, extrém körülmények között is képes szaporodni, így alacsony pH értékű, alacsony hőmérsékletű és magas só koncentrációjú közegben is szaporodik. Legnagyobb gyakorisággal húsból, halakból, zöldségfélékből, tejből és tejtermékekből mutatják ki. Azokra az élelmiszerekre, amelyek nem segítik elő a *Listeria monocytogenes* szaporodását, 100 TKE/g a határérték a fent nevezett mikroorganizmusra nézve. Azon élelmiszerekben, amelyek elősegítik az említett mikroorganizmus szaporodását „null” tolerancia van érvényben. Ezért az utóbbi élelmiszerek csoportjában, amennyiben akár egyetlen baktériumot is kimutatnak az élelmiszerben, azonnal vissza kell hívni az összes terméket. Ez hatalmas gazdasági kiesést jelenthet az élelmiszeripari vállalatok számára. A kórokozó jelentős egészségügyi kockázattal bír a lakosság körében, a maga nagyjából 30%-os letalitási arányával. Az első bizonyítottan élelmiszer eredetű megbetegedés 1981-ben történt, majd ezután számos hasonló eset volt megfigyelhető, amelyet már egyértelműen ennek a mikrobának tulajdonítottak. Napjainkban, leggyakrabban az úgynevezett fogyasztásra kész, „ready-to-eat” élelmiszerekben fordul elő ez a patogén mikroba, amelynek elfogyasztása után jelentkezik a megbetegedés. Ennek oka, hogy a megvásárolt terméket a fogyasztók nem készítik el az előírtaknak megfelelően, ezért nem éri a baktériumot a kellő hőhatás. A liszteriózis által leginkább veszélyeztetett csoportok közé a várandós anyák, az idős emberek, a legyengült immunrendszerű egyének és az újszülöttek tartoznak. Kezdetben enyhe influenzaszerű megbetegedés tapasztalható, majd a betegség manifesztálódása után egyre súlyosabbak lesznek a tünetek, halvaszületést, vetélést idézhet elő. A fent leírtak alapján, mind élelmiszeripari, mind egészségügyi szempontból fontos tehát a *Listeria* fajok kimutatása az élelmiszerekből, amelyet a hagyományos tenyésztési eljárások mellett ma már gyors, automatizált mikrobiológiai technikák segítségével is elvégezhetjük.

A hagyományos mikrobiológiai vizsgálati módszerek anyag és időigényes eljárások. Az eredmény közzlése esetenként napokat is igénybe vehet. Az élelmiszerbiztonsági és minőségbiztosítási rendszerek azonban megkövetelik a gyártóktól a termék egyéb jellemzői mellett a mikrobiológiai állapot gyors felmérését, ellenőrzését is. A rövid időn belül rendelkezésre álló mikrobiológiai vizsgálati eredményekhez nélkülözhetetlenek a gyorsmódszerek. Ezek az eljárások gyakran alacsonyabb költségek mellett teszik lehetővé a könnyen elvégezhető vizsgálatok kivitelezését. A vizsgálati idő lerövidítésére és a mérések automatizálására többféle mérési rendszer is elterjedt, mint a vezetőképesség változás

detektálásán alapuló impedimetriás berendezések, az áramlásos citometria elvén működő berendezések, a turbidimetriás mérőműszerek stb. Az automatizált gyors vizsgálati módszerek között viszonylag újnak számít a redox- potenciál változás mérésén alapuló szaporodás detektálására alkalmas Micro Tester elnevezésű berendezés, amelyet a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar, Élelmiszer-higiéniai Tanszékének és a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Fizika és Automatizálás Tanszékének munkatársai fejlesztettek ki. A berendezés segítségével, a fent említett faj élelmiszerben való jelenléte kimutatható. Kísérleteim során a Micro Tester berendezés alkalmazhatóságát vizsgáltam különböző *Listeria* fajok szaporodásának detektálására.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A *Listeria* nemzetség

2.1.1. *Listeria* fajokról általában

A *Listeria* nemzetség egy fakultatív anaerob, Gram pozitív, ubiquiter nemzetség, amely azt jelenti, hogy a környezetben széles körben megtalálható mikroorganizmus (Miller *et al.*, 2009). A baktériumok országába, *Firmicutes* törzsbe, *Bacilli* osztályba, *Bacillales* rendbe, *Listeriaceae* családba, *Listeria* nemzetségbe tartozik. Motilis, kataláz-pozitív, oxidáz-negatív mikroba, amely β -hemolizint termel. Mozgásszerve az ostor (Adams és Moss, 2008). A nemzetség örökítőanyag összetételben hasonlóságot mutat a *Staphylococcus*, illetve a *Bacillus* nemzetségekkel, mivel DNS szekvenciájukban alacsony G+C (guanin+citozin) tartalommal rendelkeznek (Buchrieser *et al.*, 2003).

Nemzetségük, egyes tanulmányok szerint hat fajra osztható, amelynek képviselői a következők:

- *Listeria ivanovii*
- *Listeria innocua*
- *Listeria monocytogenes*
- *Listeria grayi*
- *Listeria seeligeri*
- *Listeria welshimeri* (Ryu *et al.*, 2013).

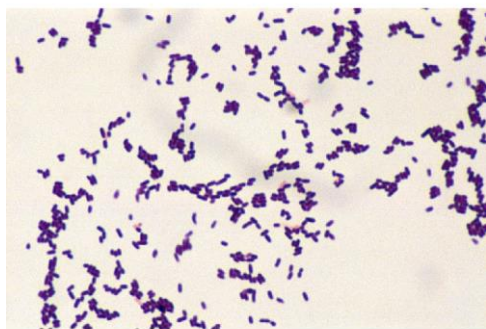
Az ismert hat *Listeria* faj az elmúlt években kiegészült 4 újonnan izolált *Listeria* fajjal: *Listeria martii*, *L. rocourtiae* (den Bakker *et al.*, 2010), *L. fleischmannii* és *L. weihenstephanensis* (Hellberg *et al.*, 2013).

Kimutatásukhoz nagy érzékenységű, gyors, automatizált és olcsó módszerekre van szükség. Habár számos genotípuson, illetve fenotípuson alapuló eljárás létezik, mégis kevés módszer felel meg az eszközökkel szemben állított kritériumoknak (Rebuffo-Scheer *et al.*, 2008).

Széles hőmérsékleti tartományt képesek elviselni (0-45°C), illetve pszichrotoleránsak, ami azt jelenti, hogy alacsony hőmérsékleten is képesek szaporodni. Hőmérsékleti optimumuk 30-37°C (Nufer *et al.*, 2007). Tág pH tartományt (pH 4,5-9,2) képesek elviselni (Miller *et al.*, 2009).

A baktériumot leginkább hús és fermentált hústermékekből lehet kimutatni, de megtalálható a zöldségekben, pasztörizálatlan tejben és tejtermékekben is. A nemzetségen belül, amennyiben a már jól ismert hat fajra való felosztást vesszük figyelembe, két patogén, és négy apatogén, vagyis nem-patogén fajt különíthetünk el. A *Listeria monocytogenes* bizonyítottan humán megbetegedést okoz, de az utóbbi években jelentettek eseteket *Listeria ivanovii* által okozott megbetegedésekről is (den Bakker *et al.*, 2010). Az apatogén fajok a *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, és *Listeria grayi* (Schmid *et al.*, 2004). Habár a humán, illetve állati liszteriózis okozta megbetegedésekért felelős mikroba 85%-ban a *Listeria monocytogenes*, ritkán ugyan, de van rá példa, hogy a *Listeria ivanovii* és *Listeria seeligeri* is okoz megbetegedéseket (Ryu *et al.*, 2013).

2.1.2. A *Listeria monocytogenes* faj jellemzői



A *Listeria monocytogenes* (1. ábra) invazív opportunist (Buchrieser *et al.*, 2002). Az élelmiszeripari jelentőségét a fentebb említett szélesspektrumú környezeti tényezőkkel szembeni ellenállósága adja. A 4°C-os hűtési hőmérsékleten is szaporodásra képes, bár ez a hőmérséklet jelentősen

1. ábra: *Listeria monocytogenes*, megnöveli a generációs idejét (Diez-Gonzales *et al.*, 2007).
forrás: (www.msefans.com)

Oxigén hiányában, illetve magas, akár 10%-os koncentrációjú sóoldatban is szaporodik (Mellefont *et al.*, 2006). Élelmiszer eredetű patogén mikroorganizmus, mely nemcsak az emberekre, hanem az állatokra is veszélyes (Milillo *et al.*, 2009).

Szaporodása függ az élelmiszer összetételétől, illetve annak tárolási körülményeitől (Pal *et al.*, 2008), de klinikai mintákban is előfordul (Jadhav *et al.*, 2012). Kimutatása szintén magas arányt mutat a fogyasztásra kész, „ready-to eat” élelmiszerekben (Miller *et al.*, 2009).

A *Listeria monocytogenes* illetve *Listeria ivanovii* fajok okozzák a nemzetségen belül, a liszteriózisnak nevezett betegséget, amely egyaránt veszélyes emberekre illetve állatokra nézve (Schmid *et al.*, 2005). A *Listeria monocytogenes* egészségügyi ártalmat jelent azokra a fogyasztókra, akik hosszán eltartható élelmiszereket fogyasztanak, ezért számos tanulmány fókuszál ennek a fajnak a jellemzésére (Mellefont *et al.*, 2006).

Detektálása az élelmiszeripari vállalatok számára gazdasági szempontból felbecsülhetetlen fontosságú, mivel amennyiben a kibocsátott élelmiszerekben kimutatható a jelenléte, azonnal vissza kell hívni az összes élelmiszert (Gnanou Besse *et al.*, 2010).

Jelenlétére „null tolarencia” van érvényben azokban az élelmiszerekben, amelyek a szaporodását elősegíthetik. Ez azt jelenti, hogy amennyiben az élelmiszer 25 grammjában akár egyetlen baktériumot találnak, azonnal vissza kell hívni az összes élelmiszerből gyártott és forgalmazott tételt (Aznar *et al.*, 2012).

2.1.3. A liszteriózis

A liszteriózis kórokozója ritkán a *Listeria innocua*, illetve *Listeria seeligeri*, leggyakrabban a *Listeria monocytogenes*, amely a humán illetve állati megbetegedésekért 85%-ban felelős (Ryu *et al.*, 2013). A humán fertőzések legfőbb oka, a fertőzött élelmiszerek elfogyasztása. A megbetegedés kis számú előfordulása ellenére, jelentős egészségügyi kockázattal bír a lakosság körében (Carvalho *et al.*, 2010). A FoodNet adatai szerint, ez a betegség 30%-os letalitási (halálozási) aránnyal bír (Jadhav *et al.* 2011).

A bizonyítottan első élelmiszer eredetű megbetegedés 1981-ben történt káposztasaláta fogyasztását követően (Schleck *et al.* 1983). 1981-től számos liszteriózisos megbetegedés volt megfigyelhető, amelyet egyértelmű tünetei alapján ennek a megbetegedésnek azonosítottak. A legnagyobb valószínűséggel a következő élelmiszerek elfogyasztását követően történhet megbetegedés: pasztörizálatlan nyers tej, lágy és kemény sajtok, hagyományosan elkészített fermentált száraz hústermékek, fagylaltok, nyers tojás, nyers csirke, nyers vörös húsok, főtt húsok, kagylók, tengergyümölcsök, előre csomagolt saláták (McClure *et al.*, 1997), szárított hústermékek (Gnanou Besse *et al.*, 2010). A liszteriózis leggyakrabban „ready-to eat” élelmiszerek elfogyasztását követően üti fel a fejét (Miller *et al.*, 2009).

Fertőzés esetén a tünetek kezdetben egy enyhe influenzás megbetegedéshez hasonlítanak, majd miközben a liszteriózis manifesztálódik, fokozatosan súlyosabbá válnak a tünetek (Mellefont *et al.*, 2006). A későbbiekben például agyhártyagyulladást, vérméregzést, halvaszületést és abortuszt eredményezhet (Juck *et al.*, 2012). A nem invazív fajok gyenge élelmiszermérgezéshez hasonló tüneteket produkálnak, mint lázat, fejfájást, hasmenést, gastroenteritist (Orsi *et al.*, 2011). A liszteriózis által leginkább veszélyeztetett csoportok a következők:

- Idős emberek
- Várandós nők
- Legyengült immunrendszerű egyének
- Újszülöttek (Gnanou Besse *et al.*, 2010).

Az USA-ban évente 2500 megbetegedésből 500 halállal végződik (Juck *et al.*, 2012). Európában a liszteriózisos esetek számának növekedése 2000-től figyelhető meg (Orsi *et al.*, 2011). Franciaországban fertőzött sertésnyelv elfogyasztása okozott 279 megbetegedést, amelyből 63 eset halállal végződött (McClure *et al.*, 1997).

2.1.5. *Listeria monocytogenes* és *Listeria innocua* kapcsolata

A *Listeria monocytogenes* és a *Listeria innocua* fajok 0-45°C hőmérséklet és 4,5-9,2 pH tartományban fordulnak elő, ezért az egyes fajok meghatározása gyakran ugyanazon élelmiszermintákban bonyolultabb folyamatot igényel (Miller *et al.*, 2009). Számos tanulmány azt mutatja, hogy a vizsgálatok során a *Listeria innocua* elfedheti a *Listeria monocytogenes*-t, ami megtévesztő eredményeket adhat az utóbb említett mikroorganizmus meghatározása folyamán (Carvalho *et al.* 2010). A *Listeria innocua* generációs ideje rövidebb időtartamú, mint a *Listeria monocytogenes*-é. Yokoyama és munkatársai (2005) kimutatták, hogy a *Listeria innocua* törzs bakteriocin szerű anyagot, illetve bakteriofágokat állíthat elő, amelyek gátolják a *Listeria monocytogenes* növekedését.

2.2. Mikrobiológiai gyorsmódszerek

2.2.1. Mikrobiológiai gyorsmódszerek általános áttekintése

A mikroorganizmusok kimutatása hagyományos mikrobiológiai módszerekkel rendkívül idő és munkaigényes. A hagyományos mikrobiológiai kimutatási módszerekre jellemző, hogy a különböző táptalajok (szelektív illetve differenciáló táptalajok) nagyon költségesek, a folyamat rendkívül időigényes, eredményeket sokszor csak több, akár 3-5 nap elteltével kapunk, míg a kórokozók azonosításához még további időre van szükség (5-7 nap). Miután bevezették a modern minőségbiztosítási rendszereket, szükségessé vált gyors mikrobiológiai módszerek kidolgozása, illetve azok alkalmazása. A gyorsmódszerek

bevezetésére azért volt szükség, hogy lecsökkentsék a vizsgálat és az eredmény közlése közötti időt. Az új eljárásokkal szemben támasztott alapvető követelmény, hogy azok minél gyorsabban, minél több mintából, kevesebb munkával, olcsóbban legyenek elvégezhetőek és a korábbinál több információt szolgáltatassanak eredményül. Fontos, hogy az alternatív módszert a nemzetközi szabványosító testület elfogadja, átessen a validálási eljáráson, és kellően gyors legyen (Deák *et al.*, 2006). A validálás egy folyamat vagy művelet megvalósulásának megbízhatóságát igazoló eljárások összessége (Farkas, 2011). Azt bizonyítja, hogy az új módszer technikai teljesítő képessége összehasonlítható a szabványos módszerekkel, így alkalmas lehet adott mikroba vagy mikrobacsoport kimutatására vagy mennyiségi meghatározására. Ezek a korszerű módszerek, nemcsak a mikrobiológia területén végzett számos kutatási eredményt használják fel, hanem felhasználásra kerülnek általuk biokémiai, kémiai, elektronikai, illetve számítástechnikai eredmények és lehetőségek is. A gyorsmódszerek ellentétben a hagyományos kimutató módszerekkel, nagyobb műszerezettséget igényelnek, illetve működésük folytonossága automatizálással van megoldva. Jelentőségük nemcsak a gyorsaságukban rejlik, hiszen segítségükkel különböző laboratóriumok eredményei is összehasonlíthatóvá válnak. A gyorsmódszerek a mikroba mennyiségi meghatározását, kimutatóját, illetve kizárását közvetlenül a vizsgálati anyagból rendkívül rövid idő alatt teszik lehetővé (Deák *et al.*, 2006).

A kereskedelemben elérhető készülékek különböző lehetőségekkel bírnak. Mindegyikhez tartozik számítógépes felület, különböző hőmérséklet kombinációk alkalmazhatóak (4-60°C között), valamint lehetőség nyílik egyidejűleg nagyszámú tesztek véghezvitelére. Az elemzéseket rövid idő alatt véghez lehet vinni, ezek közlése nagyon gyors, szemben a klasszikus módszerekkel. Az automatizált technikák belső szabályozása biztosítja az analitikai minőséget. A hagyományos azonosítás, figyelembe véve a biokémiai, morfológiai és szerológiai jegyeket, nehézkes és még nem kellően elterjedt az élelmiszeriparban. Számos automatizált rendszert alakítottak ki az évek során. Először klinikai izolátumokra fejlesztették ezeket, de egyre több rendszer bővül élelmiszer eredetű mikrobiális adatbázisokkal. A baktériumok meghatározását fenotípusos, illetve genotípusos módszerrel lehet elvégezni. Habár számos fenotípusos módszer ad ésszerű eredményeket és használatuk egyszerű, mégis inkább a genotípusos módszereket alkalmazzák, a jobb megkülönböztethetőség miatt. A leggyakrabban használt módszerek: DNS restrikciós endonukleáz analízis, ribotipizálás, pulzáló elektroforézis (PFGE), illetve a PCR-en alapuló módszerek alkalmazása. (Otero *et al.*, 1998). A gyorsmódszerek és az automatizálás egy

dinamikusan fejlődő területet képvisel a mikrobiológiában. Ez a terület az elméleti és az alkalmazott mikrobiológiában egyaránt széles területet foglal el. Egyesíti a mikrobiológiai, kémiai, biokémiai, fizikai, immunológiai és szerológiai módszereket, amelyeket az izolációra, detektálásra, jellemzésre lehet felhasználni, illetve jellemzi a mikroorganizmusokat, termékeiket a klinikai, a klinikai élelmiszer, ipari és környezeti mintákban. Először az egészségügyben kezdődött el a mikrobiológiai módszerek automatizációja, ekkor még az élelmiszeripar 10 évvel le volt maradva mögöttük, de később behozta a technikai lemaradását. A módszerek gyorsasága azt jelenti, hogy a folyamatok nagyon gyorsan végbe mennek, akár órák, percek, pillanatok alatt is (Fung, 1992).

2.2.2. Hagyományos módszerek gyorsítása és automatizálása

A hagyományos tenyésztésen alapuló mikrobiológiai módszerek meggyorsítását lehetővé teszik az egyszer használatos eszközök, (általában eldobható, műanyagból készült eszközök, úgymint a műanyag pipetták, a Petri-csészék, kémcsövek stb.). Homogénezésre a ma már széles körben elterjedt Stomacher készüléket alkalmazzák, amelybe eldobható, steril műanyag tasakba helyezett mintát helyeznek. A készülék periodikusan mozgatja a mintát, amely aprításon és homogenizáláson megy keresztül a folyamat során. Gravimetriás hígító készüléket alkalmaznak a mintaadagolás, illetve a hígítás automatizálására, amely a pontosan kimért mintamennyiséghez általában tízszeres hígításnak megfelelően adagolja a hígító folyadékot (Deák *et al.*, 2006).

Számos technológiai előny származik a klasszikus folyamat automatizálásából. Lemezöntésnél az elfogadott Petri-csészés módszer mellett alkalmazhatóak különböző lemezek, amelyeket adott mikrobátípusra állítanak elő az igényeknek megfelelően. Az automatizált kolóniaszámláló a telepekről készített képeket szofver segítségével feldolgozza és a telepek optikai tulajdonságaitól függően számolja le azokat, kizárva az élelmiszer részecskékből adódó interferenciát. A Petrifilm-lemezek alkalmasak mezofil, pszichrotróf, koliform, *Escherichia coli*, élesztő, valamint penészek számlálására egyaránt (Otero *et al.*, 1998).

2.2.3. Kémiai módszerek

2.2.3.1. ATP meghatározása

Minden élő sejt tartalmaz ATP molekulát (Pishawikar *et al.*, 1992). Az ATP meghatározási módszer egy „real time”, vagyis valós idejű (menet közben is eredményt szolgáltató) eljárás. A módszer a luciferin-luciferáz enzimrendszeren alapul, akárcsak a szentjánosbogár fénykibocsátása. Az ATP minden élő sejtben megtalálható (Deák *et al.*, 2006), amelyet a mikroorganizmusok állítanak elő, majd tárolnak, illetve felhasználnak életük során. Amikor a mikroorganizmus elpusztul, az ATP termelés megszűnik, és az általa addig termelt ATP-t rövid idő alatt elbontják az ATP-ázok és foszfatázok (Pishawikar *et al.*, 1992). Ennek segítségével a mikrobás szennyezettség nagyon könnyen kimutatható luminometriás méréssel. Az enzimes reakcióban az ATP fénykibocsátás mellett elreagál (2. ábra), amelynek mérése szolgál a meghatározás alapjául.



2. ábra: Az ATP mérés elve

A reakció pH optimuma 7-7,5, optimális hőmérséklete 15-25°C. Idő szükséglete az ATP extrakciójával együtt 15-20 perc (Deák *et al.* 2006).

2.2.4. Fizikai módszerek

2.2.4.1. Impedancia és konduktancia változtatáson alapuló módszerek

Az impedancia és a konduktancia méréseken alapul több szaporodást detektáló automata berendezés is (Bactrometer, Malthus, RABIT, BacTrac). Mérési módszerük alapja, a mikrobák szaporodása során bekövetkező ellenállás vagy vezetőképesség-változás mérése, amelyek a baktériumok illetve élesztőgombák minőségi és mennyiségi meghatározását teszik

lehetővé az élelmiszerekben. A berendezések számítógép-vezéreltek, üzemeltetésükre a teljes automatizáltság jellemző. A mérés alapja a következő: a töltéssel nem rendelkező, vagy csak kismértékben töltött vegyületek miközben a mikroorganizmusok anyagcsere-folyamata zajlik kis molekulájú töltött vegyületekké alakulnak át, és ezek növelik a tápközeg vezetőképességét. A vezetőképesség erősen hőmérsékletfüggő, ezért szabályozására nagy szükség van a mérések folyamán. A vizsgálandó mintába elektródákat helyeznek, és ezek meghatározott időközönként mérik annak vezetőképességét. A mérés során lehetőség van arra, hogy a műszer automatikusan meghatározza a detektációs időt. A detektációs idő az az időtartam, ami alatt a szaporodás által okozott változás elér egy bizonyos küszöbértéket. A detekciós idő függ a kezdeti mikrobaszámtól, a vizsgált mikroorganizmus szaporodási kinetikájától, illetve a tápközeg tulajdonságaitól és fordítottnak arányos a minta eredeti mikrobaszámával. Ha megfelelő volt a kalibráció, a detekciós időből következtethetünk a mikrobaszámra. Az indirekt vizsgálati módszer a mikrobák anyagcsere folyamatai során előállított szén-dioxidot regisztrálja. Az elektródák ebben az esetben nem érintkeznek a mintával, hanem kálium-hidroxiddal elkevert lágy agarba merülnek. Ebben az esetben a termelődött szén-dioxid a lúgos agarban elnyelődik, kálium karbonát képződik, amelynek a vezetőképessége kisebb. Itt a detekciós idő kritériuma a vezetőképesség csökkenése. A módszer élelmiszer mikrobiológiai vizsgálatokra kitűnően alkalmas. Többek között kimutatható vele a *Listeria monocytogenes* is. Az indirekt konduktometriát, hasonlóan a direkt konduktometriához, széleskörűen használják különböző környezeti tényezők, mint a hőmérséklet, a vízaktivitás, a pH hatásainak vizsgálatára. Az automatizált készülékek lehetővé teszik a kényelmes adatgyűjtést. Az adatok akár a prediktív mikrobiológiában is felhasználhatók. Nem minden mikroorganizmus képes olyan mértékű vezetőképességváltozást okozni, ami a műszerekkel direkt mérés során érzékelhető. A táptalaj vezetőképessége szintén erősen befolyásolhatja az eredményeket, ezért magas vezetőképességű tápközégek nem használhatók fel a direkt mérési módszerek esetében. Nem alkalmazhatók például azok a szelektív táptalajok, amelyek magas só koncentrációja befolyásolja a mérési eredményeket. A mikroorganizmusok által termelt egyes anyagcseretermékek szintén zavaró tényezőként szerepelhetnek a mérés folyamán. Összehasonlítva, a direkt konduktometriával, ez a módszer sokkal érzékenyebb, rövidebb detekciós idővel rendelkezik, és magasabb konduktanciaváltozás értéket produkál a mérések folyamán (Deák *et al.*, 2006).

2.2.4.2. Turbidimetria

A fotometriás automata berendezések használata is igen elterjedt, amelyekkel az oldatok turbiditását mérik. A mérés alapja, hogy a tiszta oldatokban a mikroorganizmusok szaporodnak, és szaporodásukkal egyenes arányban csökken az oldat áteresztő képessége. Ez a módszer élelmiszerminták megfigyelésére csak ritkán, például szűrt gyümölcslevek vizsgálata esetén, alkalmas (Deák *et al.*, 2006).

2.2.4.3. Flow citometria

A flow citometria (FCM) egy optikai rendszer, ami lehetővé teszi, az adott szuszpenzió sejtszámának gyors és nagyon érzékeny becslését. A mérés során a fluorescens fény kibocsátása ad információt a sejt alakjáról, méretéről és életképességéről. A fluorescens festékekkel festett sejtek vagy fluorogén szubsztrátumok analízisével meghatározhatjuk a sejt strukturális tulajdonságait és a biológiai aktivitását. A FCM fluorescens festékekkel való kombinálása hatékony módszer, mivel a megfestett mikroorganizmusok számának becslése, például borban vagy akár laboratóriumi tápközegben, elég gyors módszernek bizonyul. A legalacsonyabb baktérium sejt koncentráció, amelyet a FCM képes detektálni 10^4 sejt/ml (Malacrino *et al.*, 2001). Különböző fluorescens festék alkalmazható az antitestekre és az oligonukleotidokra (Otero *et al.*, 1998). A flow citometria alkalmazható a *Listera monocytogenes* kimutatására nyers tejből. Ezzel a kombinált módszerrel különbséget tudunk tenni a *Listeria* fajok, illetve a *Streptococcusok* és *Staphylococcusok* között (Pishawikar, *et al.*, 1992). A FCM analízissel az élelmiszerben található, összes mikrobaszámot meg lehet határozni (Malacrino *et al.*, 2001).

2.2.5. A redox-potenciál mérési módszer ismertetése

2.2.5.1. Kifejlesztése

A kísérlethez felhasznált redox-potenciál mérő berendezést, a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Élelmiszer-Higiéniai Tanszékének és a Budapesti Corvius Egyetem Élelmiszertudományi Karának, Fizika-Automatika Tanszékének munkatársai

fejlesztették ki. A szabadalmaztatott eljárás, a Micro Tester nevű berendezéssel valósítható meg (Szakmár, 2009).

2.2.5.2. A redox-potenciál mérőrendszer

A rendszer felépítése moduláris, amelyet a felhasználó mérési igényeinek megfelelően lehet bővíteni (Szakmár, 2009). A kísérletekhez számítógép vezérelt, 12 csatornával rendelkező mérőrendszer és ehhez tartozó szoftver szükséges. A szoftvert szintén az eszköz kidolgozói fejlesztették ki. A rendszer részei a következők:

- Inkubációhoz szükséges vízfürdő ($\pm 0,2^\circ\text{C}$ pontossággal)
- Teszt cellák kombinált redox-potenciál elektródokkal (Schott BlueLine 31 RX)
- Adatgyűjtő, ami a számítógéphez van csatlakoztatva, speciális szoftverrel (Windows alkalmazáshoz)
- Monitor (Reichart *et al.*, 2007).

A használható csatornaszámok tekintetében, a műszer egy készülékben maximálisan 64 csatornával rendelkezhet, amennyiben a vizsgálat a maximális csatorna számnál nagyobb léptékű mérést követel meg, a készülékek láncolhatóak, így akár 256 csatornaszám is elérhető, több készülék összekapcsolásával (Szakmár, 2009). Dolgozatomban az alkalmazott készülék maximális csatornaszáma 12 volt.

A mérés elindítása a Mérés menüpont, Start gombjának megnyomásával történik, amely után folyamatos az adatgyűjtés. Csak akkor történik meg az adatok elmentése a PC-re, ha az előzőleg be lett állítva a programban. 30 perc számítható várakozási időnek csatornánként. Az elektronika triggerelése után (számítógép csúszásai, illetve egyéb más várakozási idők miatt) a mért adatokat elmenti a rendszer, amikor ez a csatornák beállításánál be van állítva (Szakmár, 2009). A szoftver rendelkezik egy fejlett zajcsökkentést támogató alkalmazással, amely a mérés folyamán képes kizárni a környezet elektronikus zajait. Az összegyűjtött adatokat táblázatokba helyezi, amelyek könnyen felhasználhatóak, mind táblázatkezelő, mind statisztikai programok részére. A csatornák külön-külön történő beállítására is lehetőség nyílik (különböző időben történő mérés elkezdése). Behelyettesítve a mért TTD-t (detekciós

idő) a kezdeti meghatározott kalibrációs egyenletben, a minták eredeti élősejt koncentrációja kiszámítható:

$$\lg N = a - b \times \text{TTD}$$

Ahol:

a és b a kalibrációs görbe paraméterei (Reichart *et al.*, 2007).

A módszer felhasználásának példái

Szakmár (2009) kísérletei során a fakultatív anaerob *Escherichia coli*, az aerob *Pseudomonas aeruginosa*, az aerotoleráns anaerob *Enterococcus faecalis*, a fakultatív anaerob *Staphylococcus faecalis*, az aerotoleráns anaerob *Lactobacillus plantarum* és az obligát anaerob *Clostridium perfringens* fajok által okozott redox-potenciál változás mérése során arra a kérdésre kereste a választ, hogy a táptalaj pH-ja mennyiben befolyásolja a redox-potenciál változást, mivel egy bizonyos mikrobaszám felett a pH illetve a redox-potenciál értéke is változik. A mérés eredménye szerint, amíg pH változás nem alkalmas a mikroorganizmusok sejtszámának meghatározására, addig a redox-potenciál mérés kitűnően megfelel a célnak. Az egyes fajok elkülöníthetőségét a különböző lefutású redox-potenciál görbék adják, amelyekből egyértelműen meghatározható a mintában jelenlevő mikroorganizmus.

További kísérletei során, Szakmár (2009) a Micro Tester készülék segítségével ásványvíz vizsgálatokat végzett a Coca Cola Beverages laboratóriumában, a Lengyelországban található Tylicz-ben és Zalaszentgróton. A vizsgálat során coliformokat, *Escherichia coli*-t, *Pseudomonas aeruginosa*-t és *Enterococcus faecalis*-t kívánt kimutatni. A tyliczi üzemben műszeres és klasszikus méréseket is végeztek. A zalaszentgróti Coca Cola üzemben a Micro Tester készülék segítségével ásványvíz minták mikrobiológiai jellemzőit mérték. Az ásványvíz minták mikrobiológiai paramétereit szabványos módszerekkel és redox-potenciál méréssel határozták meg. Eredményül azt kapták, hogy majdnem 100%-os az egyezés a két vizsgálat eredményei között, a módszer kitűnően alkalmas ipari körülmények között a mikroorganizmusok jelenlétének kimutatására, illetve szaporodásuk meghatározására.

Erdősi és munkatársai (2012) tanulmányukban élelmiszeripari modell felületek tamponos mintavételt követő enterobaktérium szennyezettségének vizsgálatát végezték el laboratóriumi körülmények között. Az enterobaktérium sejtek számát standard lemezöntéssel és redox-potenciál méréssel kívánták meghatározni. A redox-potenciál meghatározását a Micro Tester nevű berendezéssel végezték el. Az új módszer előnye, hogy míg a lemezöntésnél szükség van a mikroorganizmusok lemosására a tamponról, emellett akár 72 óra is szükséges a telepek kifejlődéséhez, addig a Micro Tester alkalmazása során, lemosásra nincs szükség, a mérés időtartama 10-16 óra, a baktériumok száma közvetlenül meghatározható, és a redox-potenciál görbék adataiból becsülhető a mikroorganizmusok teljes száma. A különböző laboratóriumokban azonos homogenitású mintákkal egyenlő mennyiségű szuszpenzióval lemezöntést végeztek. A minták normális eloszlást és homogenitást mutattak. Mindegyik laboratóriumban 3 párhuzamos mintasorozatot készítettek a szabványos eljárásnak megfelelően. A redox-potenciál mérésre külső kalibrációt végeztek, a mintából tízszeres hígítási sort készítettek. Összehasonlítva a két módszert, látható, hogy nincs statisztikailag szignifikáns eltérés ezek átlagos értékei, ismételhetősége és a kapott eredmények között. A redox-potenciál mérőberendezés előnye, hogy jelentős időt lehet a módszerrel megtakarítani.

Joźwiak (2009) tanulmányában a vízáktivitás *Campylobacter jejuni*-ra kifejtett hatását vizsgálta, majd redox-potenciál mérési módszerrel határozta meg túlélő sejtek számát. A kísérlet során az élősejtszám meghatározására alkalmazott berendezés szintén a Micro Tester készülék volt. A vízáktivitást az élelmiszerekre jellemző tartományba állította be. Modell tápközegbe adagolta a mikroba szuszpenziót, amely nátrium-kloriddal, glükózzal vagy glicerinnel volt kiegészítve. A kalibrációs görbe alapján megkapta a túlélő mikrobaszámot. A berendezés széles környezeti paraméterek esetében is képes volt mérni, jól alkalmazható volt a környezeti tényezők vizsgálatára.

3. Célkitűzés

Dolgozatomban a *Listeria* fajok szaporodásának detektálását tűztem ki célul, redox-potenciál mérő berendezés segítségével, amelyet a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Karának munkatársai és a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának munkatársai közösen fejlesztettek ki.

Céлом eléréséhez a következő méréseket terveztem elvégezni:

- *Listeria* fajok növekedésének vizsgálata modell oldatban és tejben
- nem-listeria fajok növekedésének vizsgálata modell oldatban.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A mérés során alkalmazott oldatok

- Hígító folyadék (0,85% NaCl, 0,1 % pepton)
- CASO agar: CASO leves (MERCK 1.05459.0500) kiegészítve 1,5% agarral (BIOLAB BAA11000)
- 1.5% os (feles) CASO-leves (MERCK 1.05459.0500)

A mérés során alkalmazott oldatokat, elkészítés után kisterileztem, és steril körülmények között használtam fel.

4.2. A mérés során alkalmazott mikrobák

A méréseim során a Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék által fenntartott törzseket használtam, amelyeket az 1. táblázat és 2. táblázat foglal össze.

1. táblázat: Felhasznált mikroorganizmusok feles CASO levesben történt mérésre:

Faj neve	Faj jelölése
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCM4699
<i>Listeria grayi</i>	CCM4029 ^T
<i>Listeria innocua</i>	CCM4030
<i>Listeria ivanovii subs. ivanovii</i>	CCM5884 ^T
<i>Listeria ivannovii subsp. londoniensis</i>	CCM4698 ^T
<i>Listeria seeligeri</i>	CCM3970 ^T
<i>Listeria welshmieri</i>	CMM3971 ^T
<i>Listeria monocytogenes</i>	H3 (kolbászpaszta)
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2 b
<i>Listeria monocytogenes</i>	3b
<i>Listeria monocytogenes</i>	L1
<i>Listeria monocytogenes</i>	L6
<i>Listeria monocytogenes</i>	L7
<i>Listeria monocytogenes</i>	L10
<i>Listeria monocytogenes</i>	L11
<i>Listeria monocytogenes</i>	L12

<i>Listeria monocytogenes</i>	L13
<i>Listeria monocytogenes</i>	L14
<i>Listeria monocytogenes</i>	L15
<i>Listeria monocytogenes</i>	L16
<i>Listeria monocytogenes</i>	L23
<i>Listeria monocytogenes</i>	80 (tejből izolált)
<i>Listeria monocytogenes</i>	191
<i>Listeria innocua</i>	213
<i>Listeria seeligeri/ welshimeri</i>	292
<i>Listeria monocytogenes</i>	T2
<i>Listeria monocytogenes</i>	1095
<i>Listeria seeligeri</i>	1153
<i>Echerichia coli</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

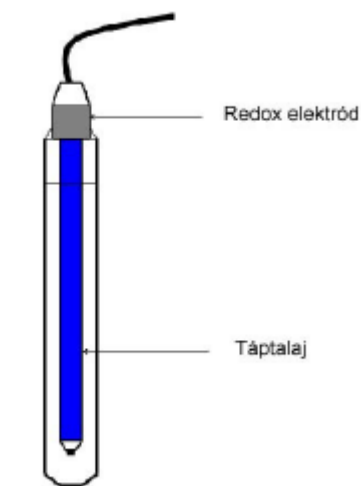
2. táblázat: A tejben végzett mérés során alkalmazott mikroorganizmusok:

Faj neve	Faj jelölése
<i>Listeria monocytogenes</i>	L1
<i>Listeria monocytogenes</i>	L6
<i>Listeria monocytogenes</i>	L7
<i>Listeria monocytogenes</i>	L10
<i>Listeria monocytogenes</i>	L11
<i>Listeria monocytogenes</i>	L12
<i>Listeria monocytogenes</i>	L14
<i>Listeria monocytogenes</i>	L15
<i>Listeria monocytogenes</i>	L16
<i>Listeria monocytogenes</i>	O13 (tejből izolált)

4.3. A mérés során alkalmazott eszközök és berendezések

4.4. A mérés menete

- A vizsgálni kívánt mikroba törzs 24 órás tenyészetéből 10^3 TKE/ml induló sejtszámmal oltottam be feles koncentrációjú CASO leveseket. A mikroba szám megfelelő beállítása McFarland Standard 2 (Bioemérieux 70900) segítségével történt. A mikrobaszámok ellenőrzésére lemezöntést végeztem.
- A redox- potenciálmérő elektródákat lemostam 70%-os etanollal és steril desztillált vízzel, majd belehelyeztem ezeket a feles CASO levesekbe (3. ábra), amelyek már tartalmazták a mikroba szuszpenziót.



3. ábra: Redox- potenciálmérő elektróda

- A mérőberendezéshez kötött számítógépen, a redox méréshez szükséges programban elvégeztem a beállításokat.
- Az elektródákat 37 °C-ra beállított vízfürdőbe helyeztem és 24 órás időtartam alatt mértem a redox-potenciál változását.

A tejben történő mérés (4. ábra) menete megegyezett a feles CASO levesben mérttel.

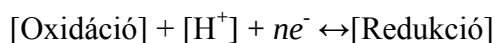


4. ábra: Redox-potenciál mérés tejben

4.4.1. A mérés során alkalmazott módszer ismertetése

4.4.1.2. Redox-potenciál mérési módszer

Ez a mérési módszer hasznos eszköz lehet a mikrobiális szennyeződés minőségi és mennyiségi meghatározásában. A bakteriális növekedés során, a táptalaj redox- potenciálja csökken. A redox-potenciál görbe alakja jellegzetes az adott mikroorganizmusra nézve, és a változás aránya (dE/dt) arányos az élő sejt koncentrációval. A berendezéssel meghatározható az az idő amely szükséges a redox-potenciálban történő szignifikáns változáshoz, amit detekciós időnek (TTD) nevezünk. Hasonlóan az impedimetriás méréshez, szigorú a lineáris korreláció van a TTD és a mikroorganizmusok kezdeti koncentrációja között. A kalibrációs görbe alapja, az élősejt koncentráció meghatározása. A redox-potenciál mérési módszer a koliform baktériumok meghatározása során volt tesztelve és validálva. A módszer alkalmazza, a tipikus oxidációs-redukciós reakciókat amelyek a biológiai rendszerekben mennek végbe mikroorganizmusok által.



A mikrobiális növekedés energiaforrása a biológiai oxidációban eredményezi a redukciót a környezetben. Mindkettő oxigénfelhasználást és a folyamat során a tápanyagok összetevőinek felhasználását eredményezi.

A redukció elektromos változást okoz, amit a Nernst egyenlettel lehet kifejezni:

$$E_h = E_0 + \frac{R * T}{n * F} * \ln \frac{[\text{oxidáció}] * [H^+]}{[\text{redukció}]}$$

Ahol:

- E_h redox- potenciál normál hidrogén elektróddal kifejezve
- E_0 normál redox- potenciál rendszer
- R gáz állandó
- F Faraday állandó
- n elektródák száma a redox rendszerben

A módszer alkalmazása a mikroorganizmusok reduktív aktivitásának kimutatásán alapul.

A redox elektródák és a mérési módszer technikájának fejlesztésével ma már lehetséges építeni az automatizált berendezések kifejlesztésre hasonlóan az impedimetriás/konduktanciás készülékekhez.

A redox-potenciál mérés számos előnnyel rendelkezik. A redox-potenciál mérést a leginkább befolyásoló tényező a mikrobiális növekedés. Ellentétben az impedimetriás/ konduktanciás készülékkel a hőmérséklet ingadozásának hatása elhanyagolható, ezért nem szükséges szigorú hőmérsékletszabályozás.

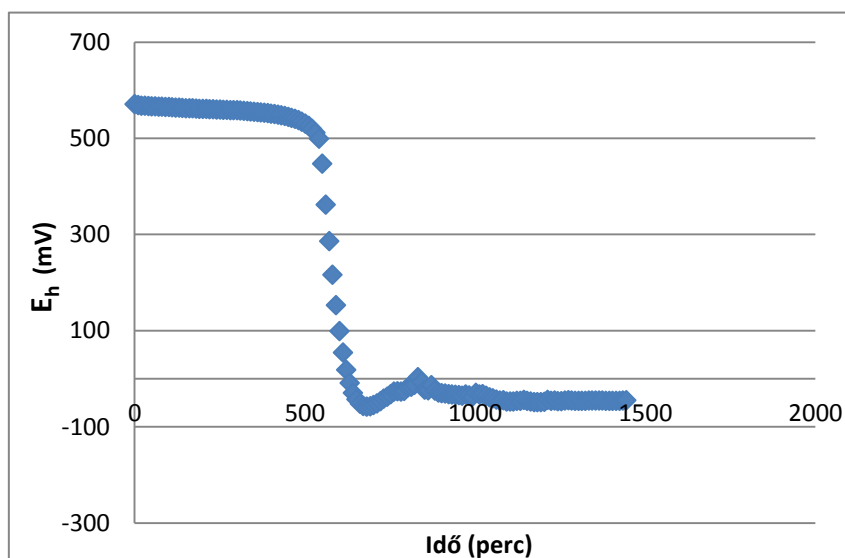
A mérési módszer folyamatának megértése egyszerű, és a redox-potenciálmérés költsége alacsonyabb szemben az impedimetriás/konduktanciás módszerekkel (Reichart *et al.*, 2007).

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

Méréseim lényege a *Listeria* fajokkal beoltott feles CASO- levesből, illetve beoltott tejből meghatározni a mikrobák által okozott redox-potenciál változást az erre alkalmas Micro Tester nevű berendezés segítségével. Munkám során az előző fejezetben felsorolt mikroorganizmusokkal végeztem mérést és ezen fajok egymástól való elkülöníthetőségét, illetve kimutathatóságát vizsgáltam tejből és feles CASO- levesből.

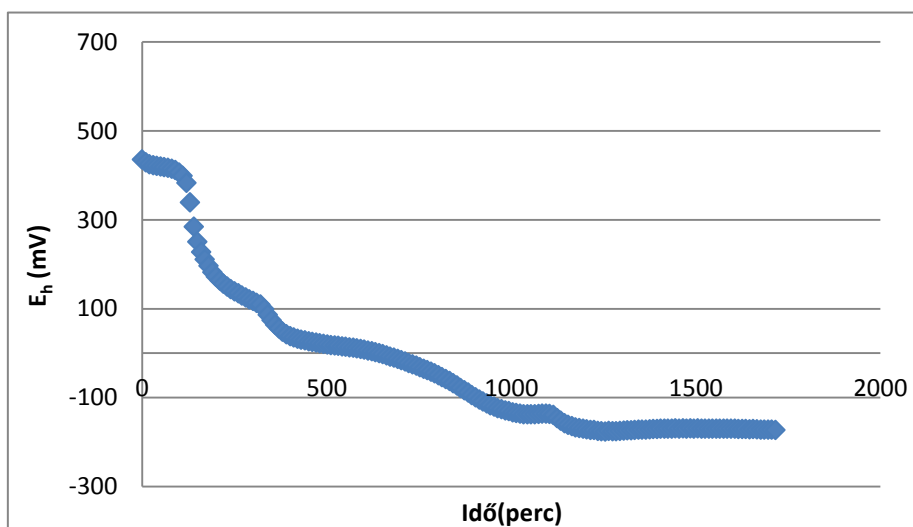
Kísérleteim során, az 1. táblázatban és a 2. táblázatban felsorolt mikroorganizmusokkal dolgoztam. A 24 óra időtartamú mérés során kapott redox- potenciál értékeket az idő függvényében ábrázoltam. Eredményeim közlése során néhány mikroorganizmus redox görbéjét mutatom be.

5.1. Különböző fajba tartozó mikroorganizmusok redox-potenciál görbéinek

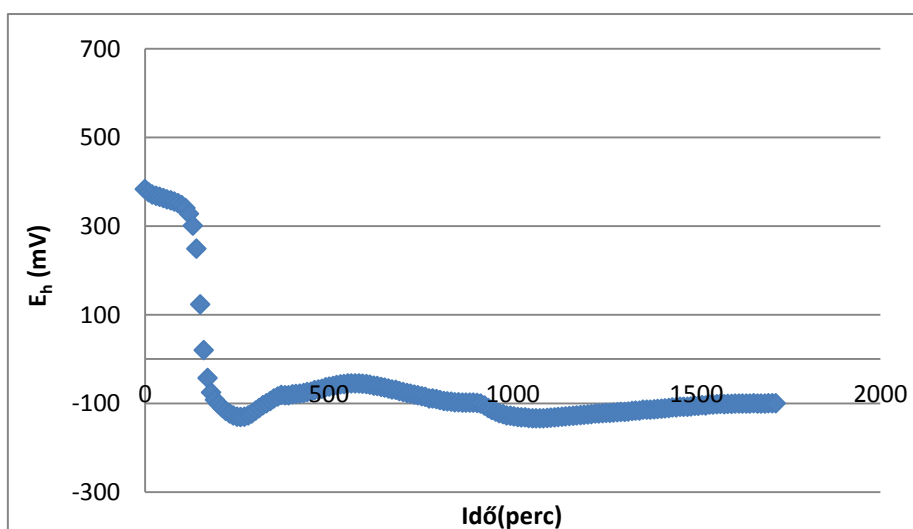


összehasonlítása

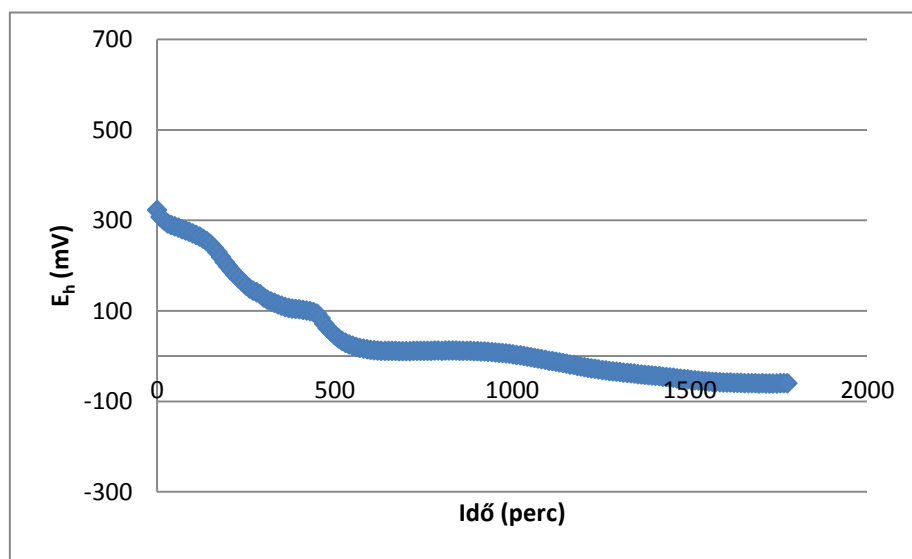
5. ábra: *Listeria monocytogenes* L23 redox-potenciál változása feles CASO-levesben mérve



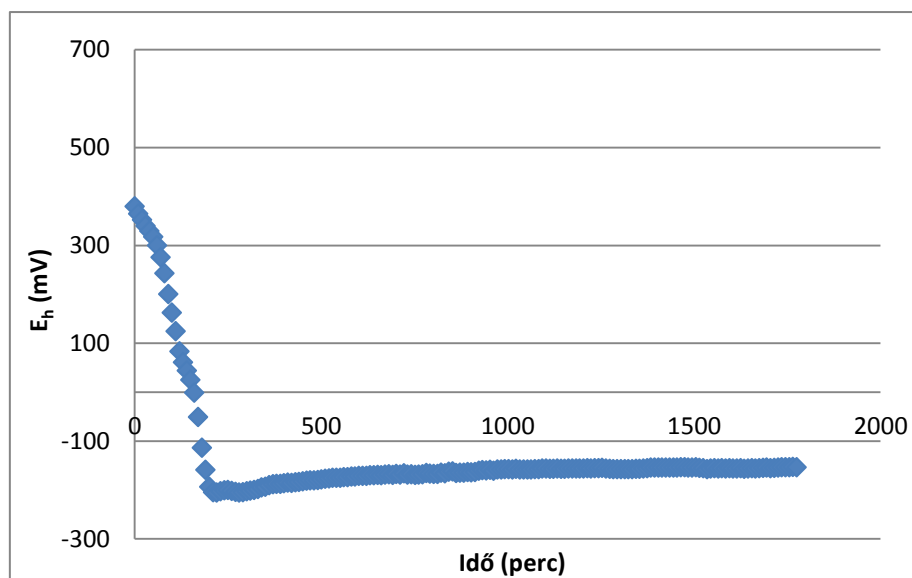
6. ábra: *Listeria innocua* 213 redox-potenciál változása feles CASO-levesben mérve



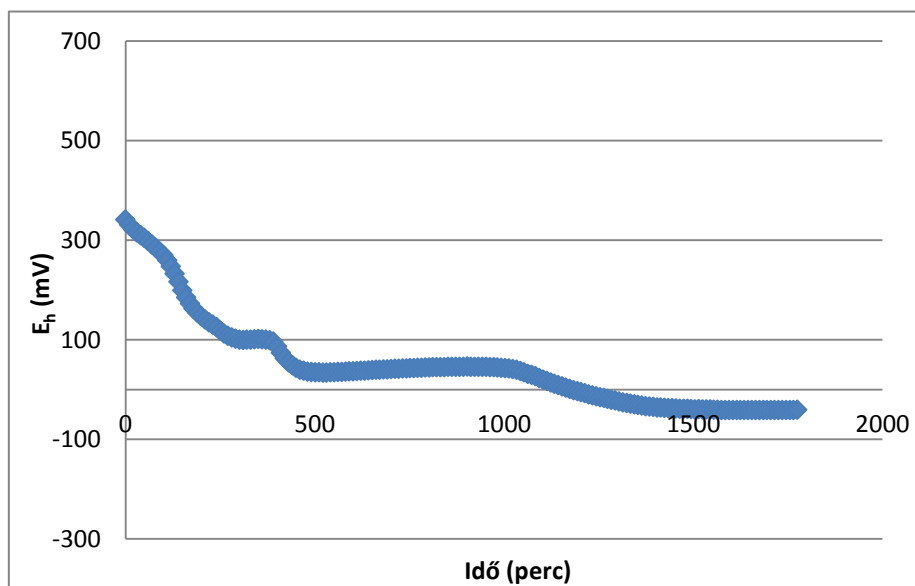
7. ábra: *Listeria seeligeri* CCM3970^T redox-potenciál változása feles CASO-levesben mérve



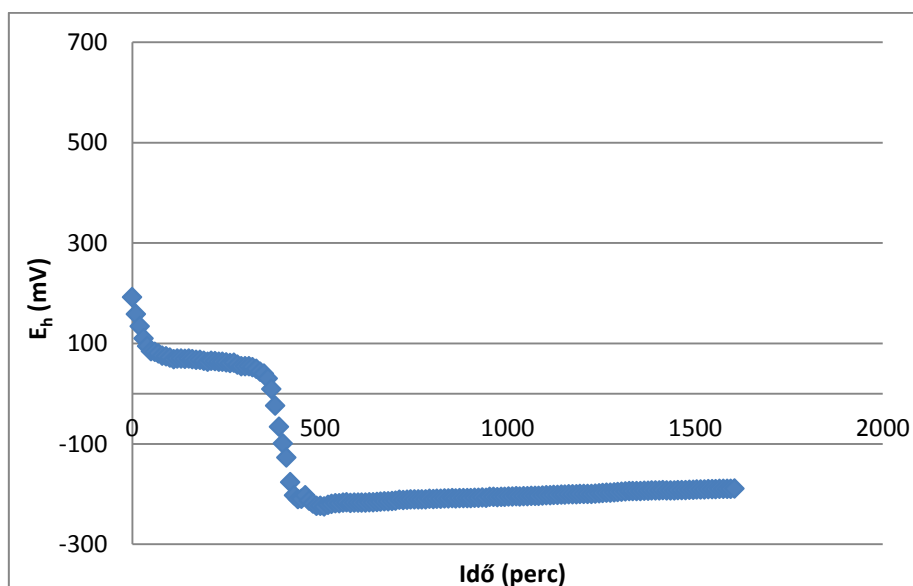
8. ábra: *Listeria welshimeri* CCM3971^T redox-potenciál változása feles CASO-levesben mérve



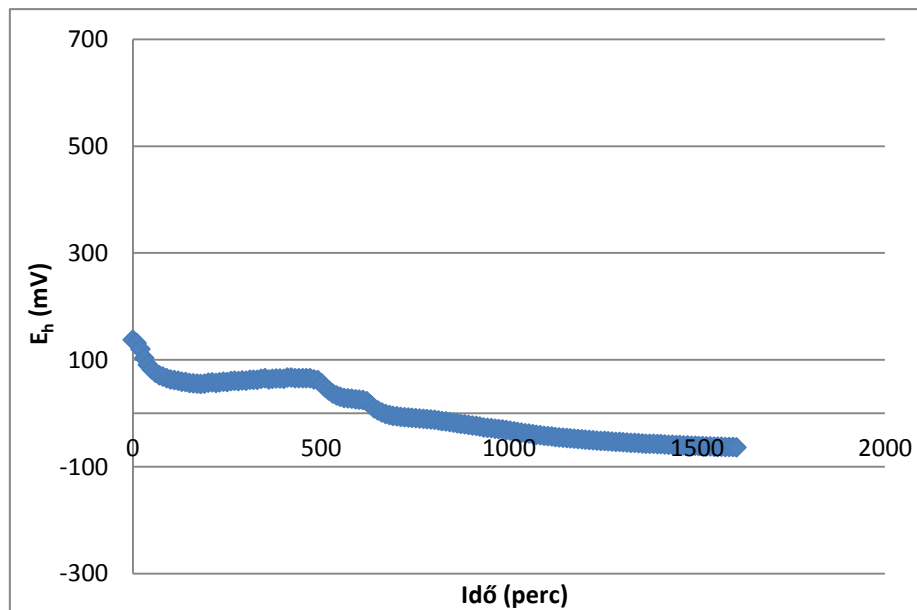
9. ábra: *Listeria grayii* CCM 4029^T redox-potenciál változása feles CASO-levesben mérve



10. ábra: *Listeria ivanovii subsp. ivanovii* CCM5884^T redox-potenciál változása feles CASO-levesben mérve



11. ábra: *Escherichia coli* redox-potenciál változása feles CASO-levesben mérve

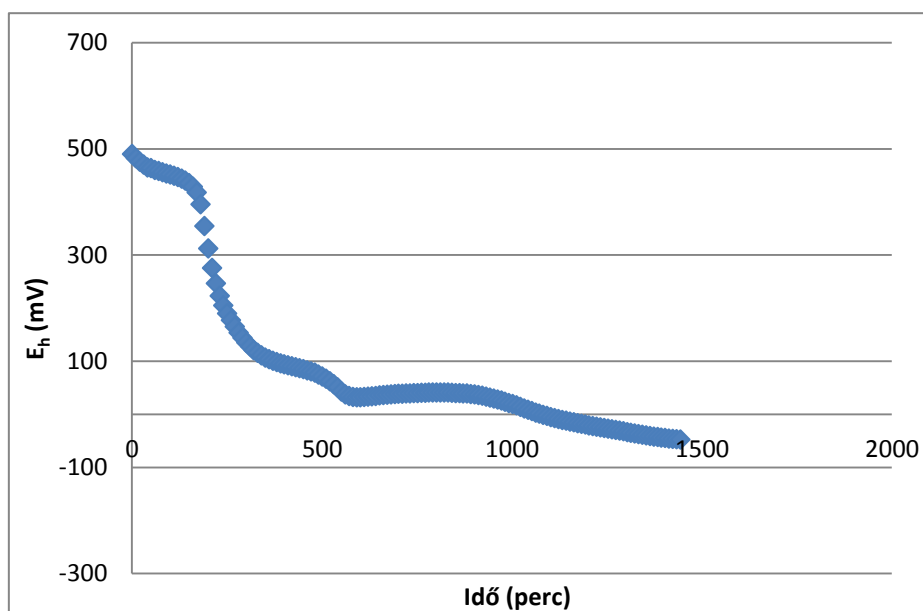


12. ábra: *Pseudomonas aeruginosa* redox-potenciál változása feles CASO-levesben mérve

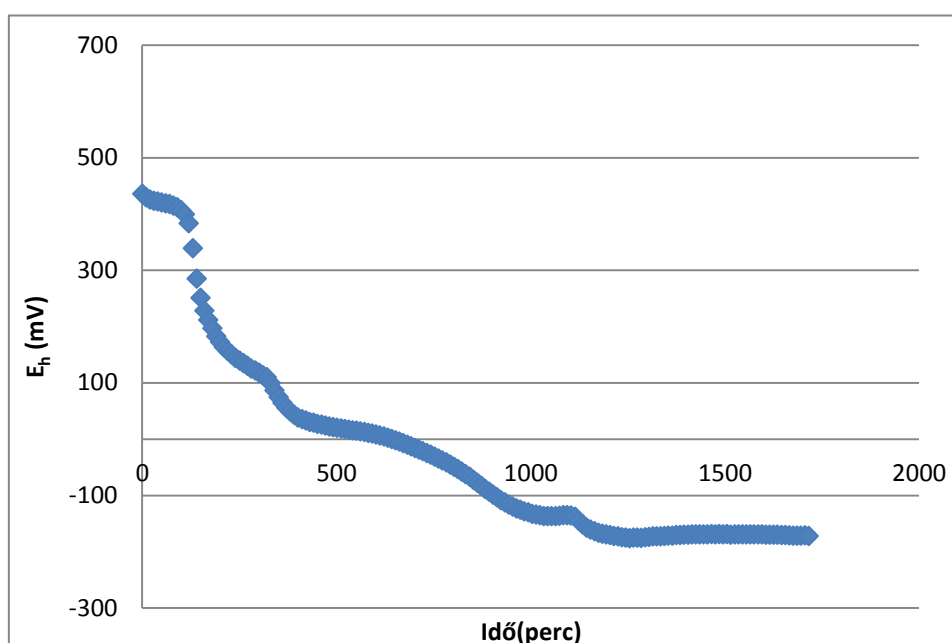
A fent közölt 5-12. ábrák mindegyike 1-1 fajt képvisel azok közül a mikroorganizmusok közül, amelyekkel kísérleteimet végeztem. A görbék lefutását megvizsgálva megállapítható, hogy bizonyos fajok - *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi* - szaporodásuk során gyors redox-potenciál csökkenést okoztak, amíg a többi fajok esetében egyenletesebb redox-potenciál csökkenést tapasztaltam. Az is megfigyelhető, hogy a különböző fajok közül egyesek pl. néhány *Listeria* faj (5, 6, 9. ábrák) nagy mértékű (akár 500 mV-ot is meghaladó) össz redox-potenciál változást okoztak, amíg más fajok csak csekély mértékű redox- potenciál csökkenést idéztek elő (*Escherichia coli* és *Pseudomonas aeruginosa*). Érdekes párhuzam, hogy az utóbbi mikroba esetén az impedimetriás mérések során is az tapasztalható, hogy csak kis mértékű impedimetria változást okoz (Mohácsi-Farkas et al., 2004). A vizsgált baktériumok redox-potenciál görbéinek lefutása alapján állítható, hogy az egyes fajok redox-potenciál görbéi egymástól jól megkülönböztethetőek. Az eredmények arra utalnak, hogy a módszer tovább fejlesztésével lehetőség nyílhat a fajok elkülönítésére, megfelelő szelektív tápközeg alkalmazásával akár kimutatására.

5.2. Nem monocytogenes *Listeria* fajok redox-potenciál görbéinek összehasonlítása és a *Listeria monocytogenes* törzsek görbéinek összehasonlítása

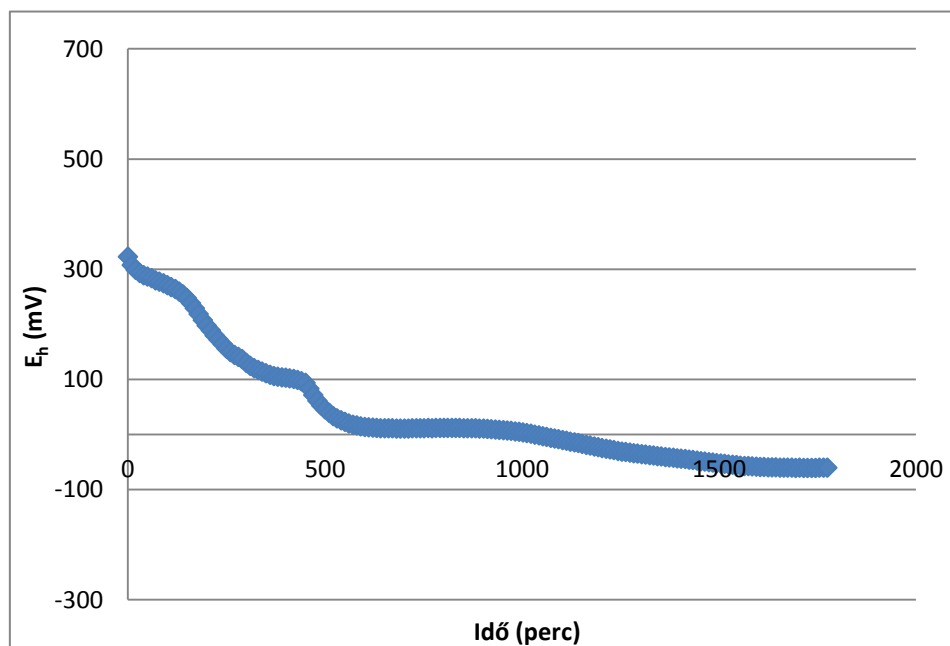
5.2.1. *Listeria* fajok redox-potenciál görbéinek összehasonlítása



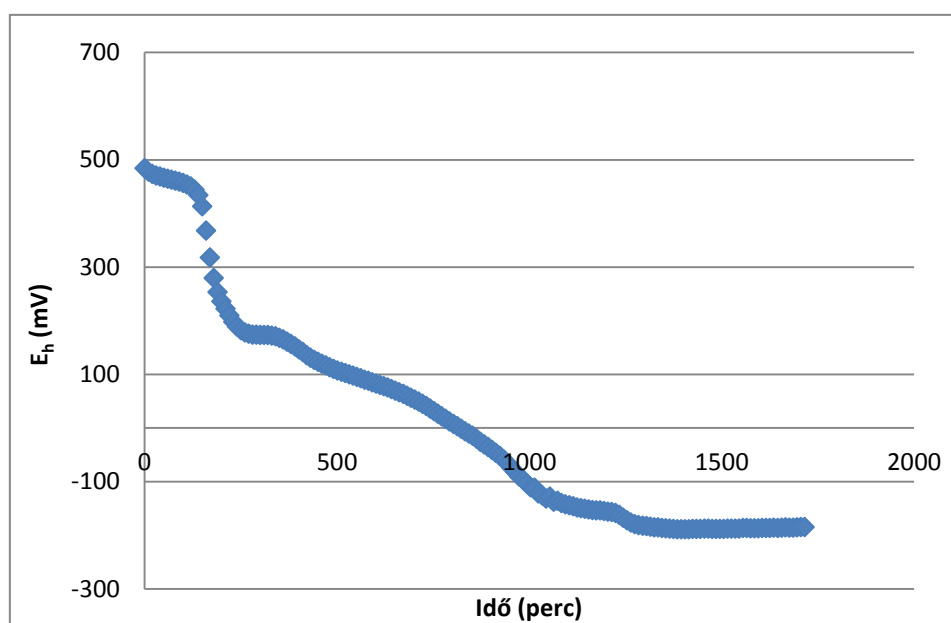
13. ábra: *Listeria monocytogenes* L16 redox-potenciál görbájének lefutása



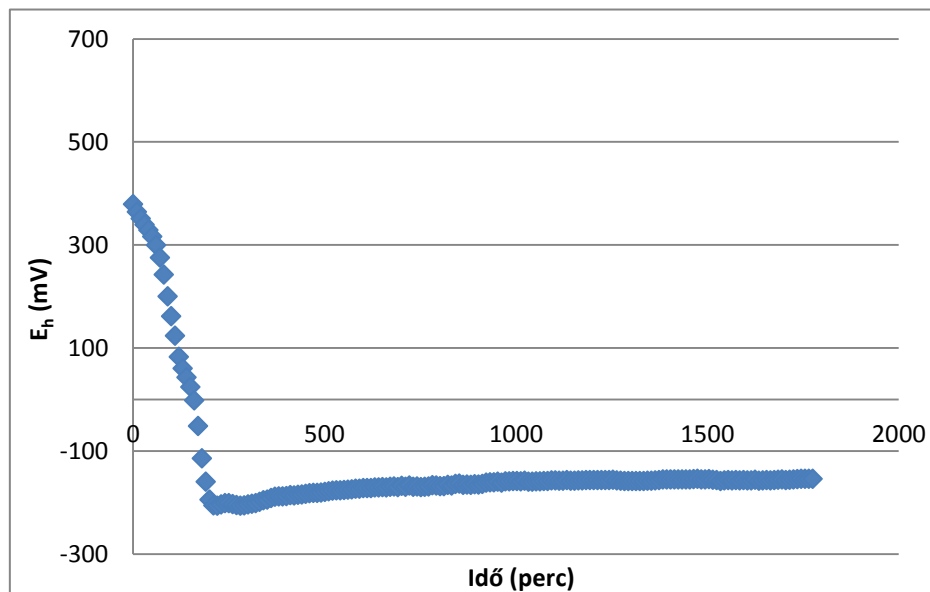
14. ábra: *Listeria innocua* 213 redox-potenciál görbájének lefutása



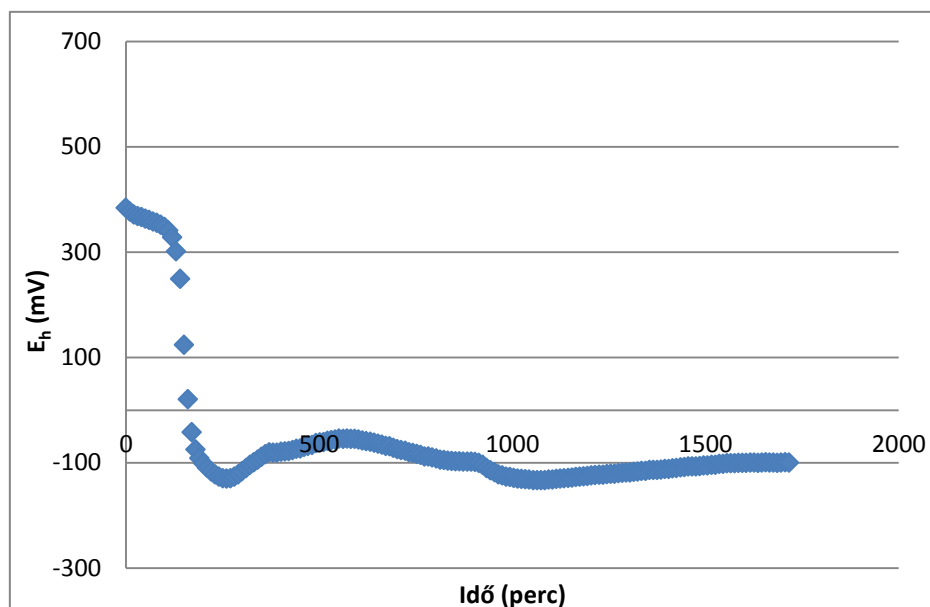
15. ábra: *Listeria welshimeri* CCM3971^T redox- potenciál görbájének lefutása



16. ábra: *Listeria ivanovii subsp. londoniensis* CCM 4698^T görbájének lefutása



17. ábra: *Listeria grayii* CCM 4029^T redox- potenciál görbájének lefutása

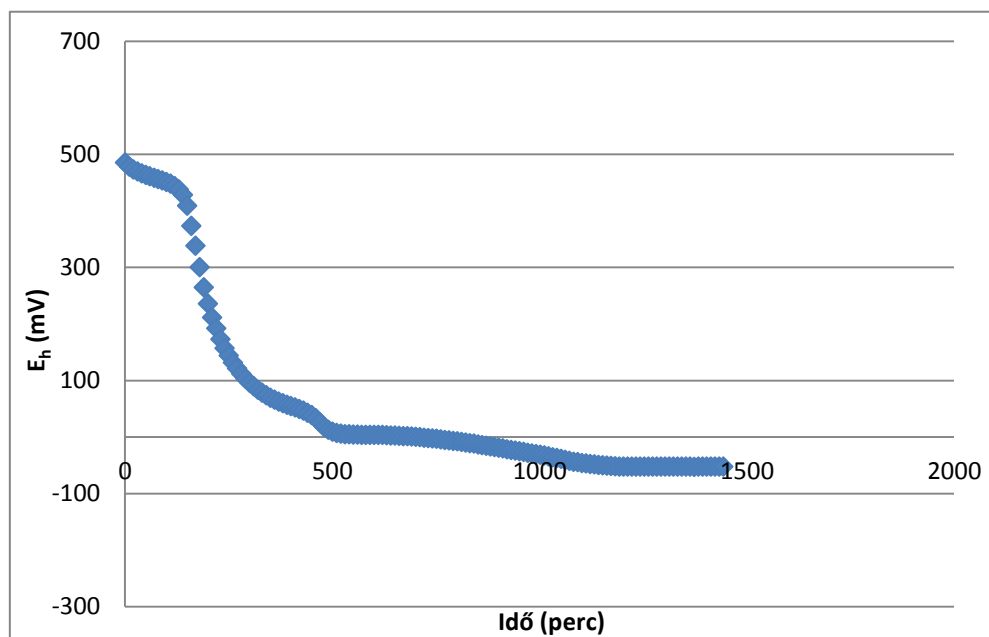


18. ábra: *Listeria seeligeri* CCM3970^T (C9) redox-potenciál görbájének lefutása

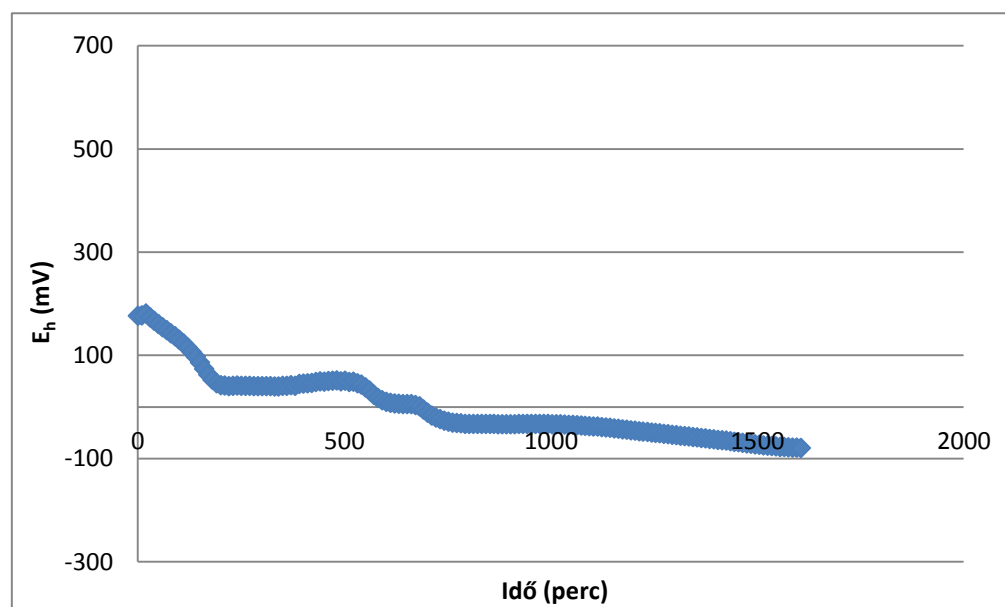
A vizsgálatok további szakaszában kíváncsi voltam arra, hogy különbséget tudok-e tenni a *Listeria* nemzetség fajain belül a redox- potenciál görbék lefutása alapján, hiszen ha

különbséget tudok tenni, akkor ez lehetőséget jelenthet egy redox- potenciál mérésen alapuló kimutatási eljárás kidolgozására, szelektivitást nyújtó tápközegek irányába elmozdulva. Az eredmények azt mutatták, hogy a *Listeria* nemzetségen belül, az egyes fajok redox- potenciál görbéinek (13-18. ábrák) összehasonlítása során, egyértelműen elkülöníthetők az egyes *Listeria* fajok, ezért a módszer véleményem szerint alkalmas a fajok egymástól való megkülönböztetésére.

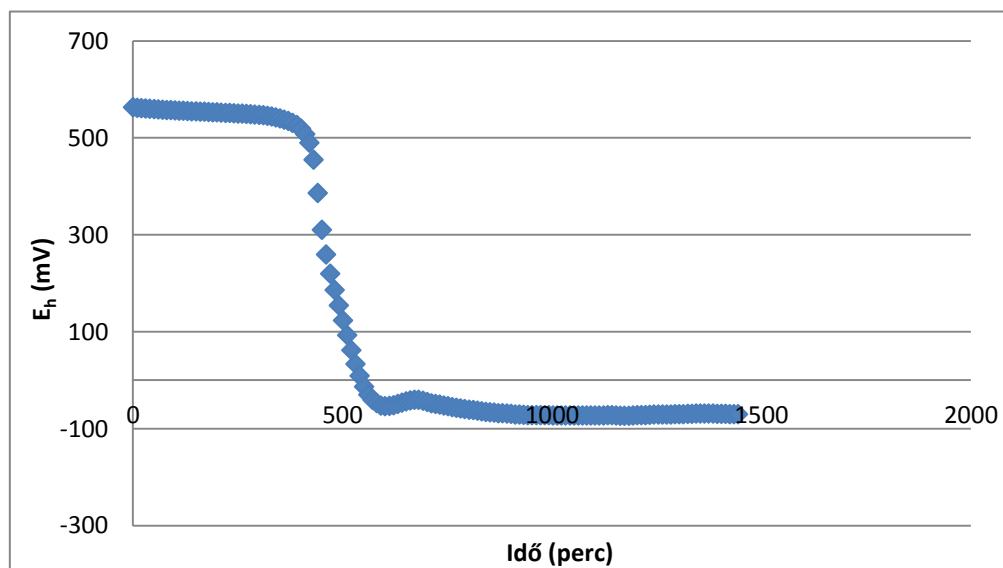
5.2.2. A *Listeria monocytogenes* törzsei redox-potenciál görbéinek összehasonlítása



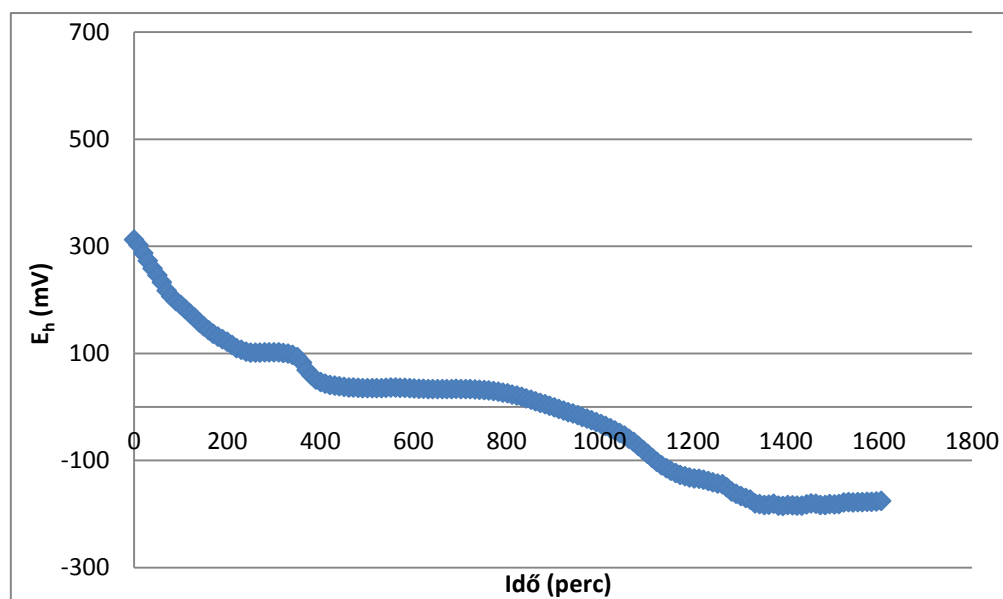
19. ábra: *Listeria monocytogenes* L14 redox-potenciál görbéjének lefutása



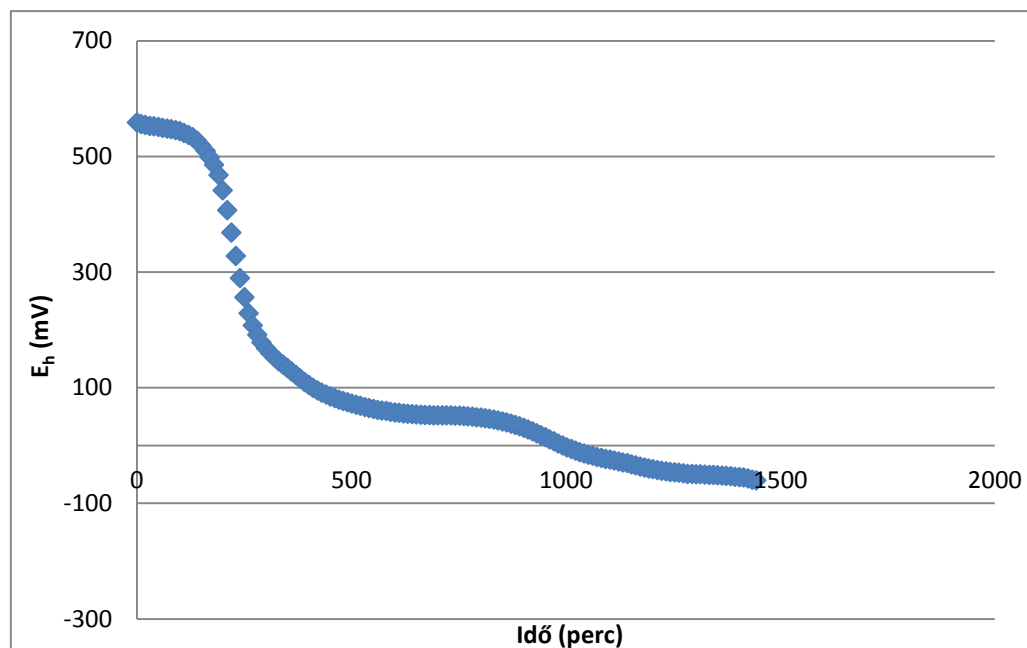
20. ábra: *Listeria monocytogenes* H3 redox-potenciál görbéjének lefutása



21. ábra: *Listeria monocytogenes* P1 redox-potenciál görbájének lefutása



22. ábra: *Listeria monocytogenes* O13 redox-potenciál görbájének lefutása

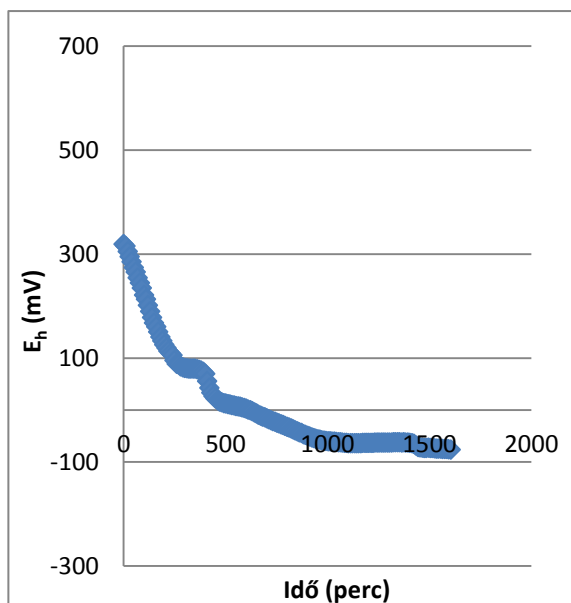


23. ábra: *Listeria monocytogenes* T2 redox-potenciál görbéjének lefutása

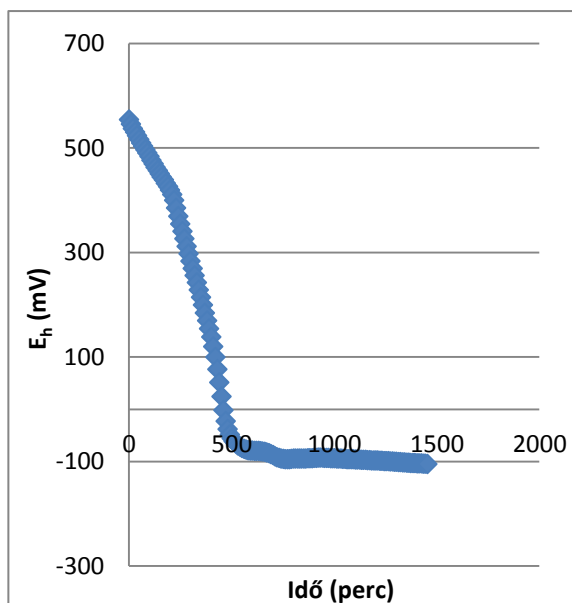
Arra vonatkozóan is végeztem méréseket, hogy a különböző *Listeria monocytogenes* törzsek által okozott redox- potenciál változások jellegzetesek-e, azok a törzsön belül hasonlóságot mutatnak-e. Sajnos eredményeim azt mutatták, hogy a *Listeria* fajok redox-potenciál görbéjének lefutása alapján a *Listeria monocytogenes* és az egyéb *Listeria* fajok nem különíthetők el egymástól (13-23. ábrák). Továbbá a *Listeria monocytogenes* faj törzseinek feles CASO-levesben detektált redox-potenciál változásai (19-23. ábrák) is azt mutatták, hogy a fajon belül az egyes törzsek görbéinek lefutása eltérő volt, bár a görbe lefutásának jellege alapján bizonyos tendenciák/csoportok megfigyelhetők. Ez megnehezíti a *Listeria monocytogenes* kimutatását redox-potenciál mérő berendezéssel.

Összegezve, ez a módszer további vizsgálatokat követően alkalmas lehet a *Listeria* nemzetségen belül a *Listeria monocytogenes* faj elkülönítésre a többi *Listeria* fajtól. Amíg a nemzetségen belül, az egyes fajok görbéi szinte teljesen elkülönülnek, a fajon belül a törzsek görbéi között találhatunk hasonlóságokat.

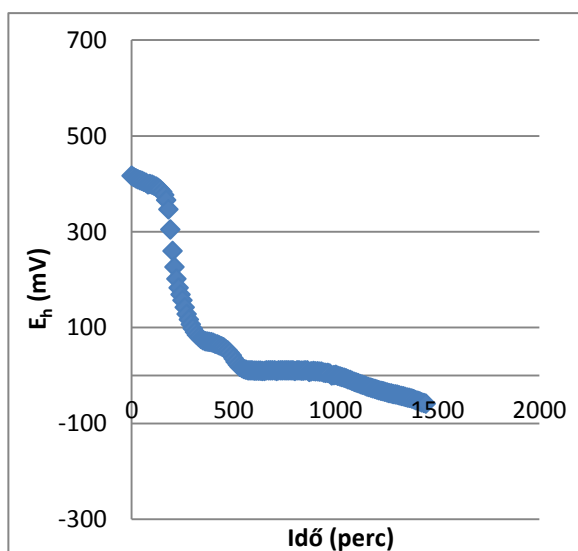
5.3. *Listeria* fajok redox-potenciál görbéinek összehasonlítása feles CASO- levesben illetve tejben végzett mérés esetében



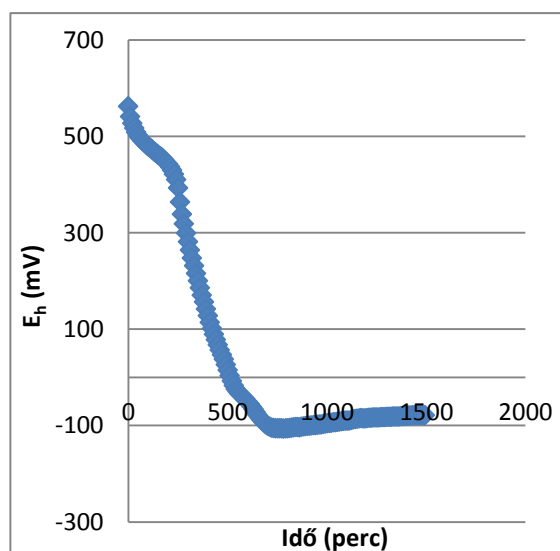
24. ábra: *Listeria monocytogenes* (L1) feles CASO-levesben mért redox-potenciál görbéje



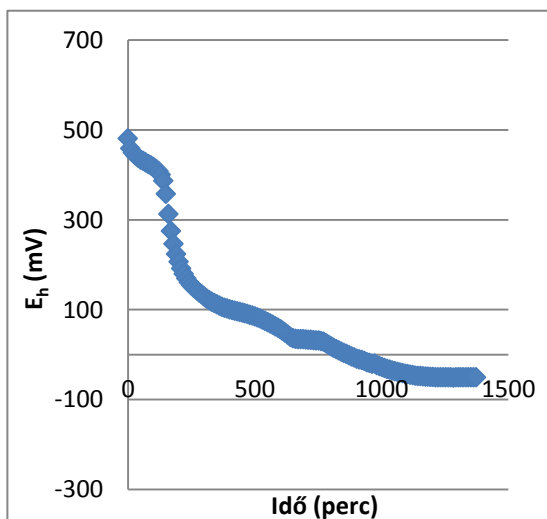
25. ábra: *Listeria monocytogenes* (L1) tejben mért redox-potenciál görbéje



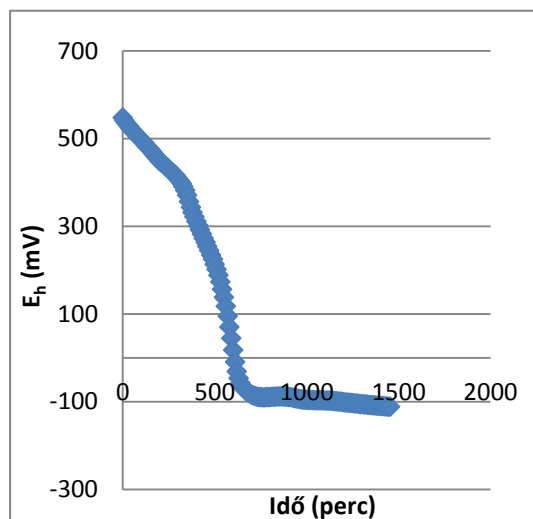
26. ábra: *Listeria monocytogenes* (L10) feles CASO-levesben mért redox-potenciál görbéje



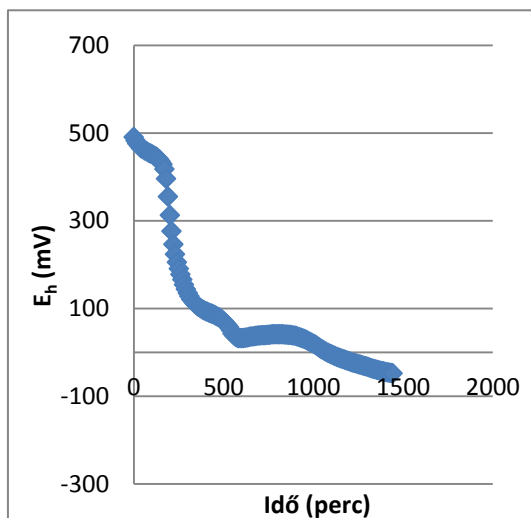
27. ábra: *Listeria monocytogenes* (L10) tejben mért redox-potenciál görbéje



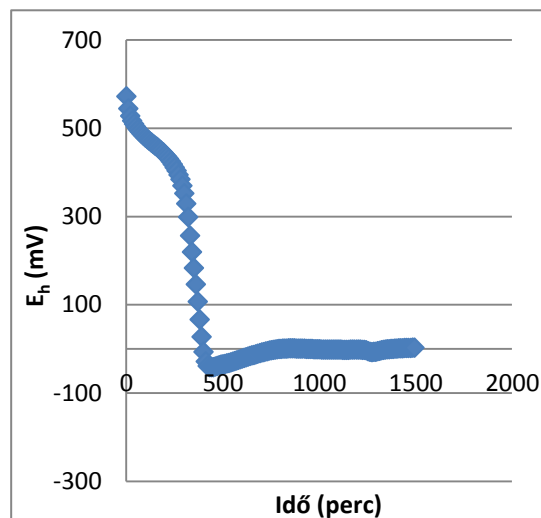
28. ábra: *Listeria monocytogenes* (L13) feles CASO-levesben mért redox- potenciál görbéje



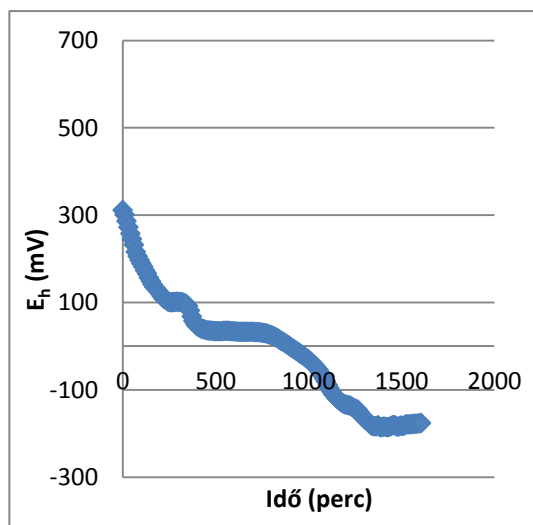
29. ábra: *Listeria monocytogenes* (L13) tejben mért redox- potenciál görbéje



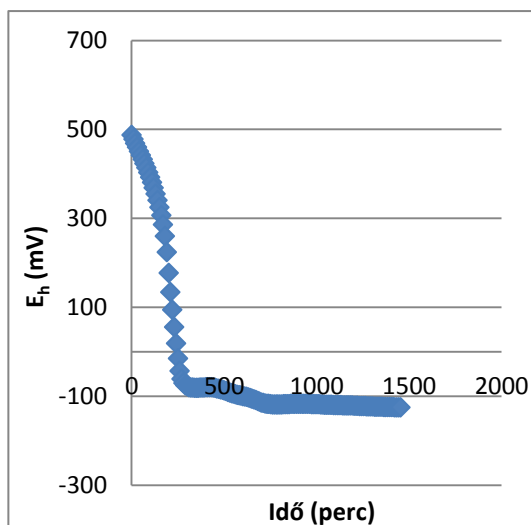
30. ábra: *Listeria monocytogenes* (L16) feles CASO-levesben mért redox-potenciál görbéje



31. ábra: *Listeria monocytogenes* (L16) tejben mért redox- potenciál görbéje



32. ábra: *Listeria monocytogenes* (O13) feles CASO-levesben mért redox- potenciál görbéje



33. ábra: *Listeria monocytogenes* (O13) tejben mért redox- potenciál görbéje

A tejben (25., 27., 29., 31., 33. ábrák), illetve a feles CASO- levesben (24., 26., 38., 30., 32. ábrák) végzett szaporodási vizsgálatok redox-potenciál görbéin jól látszik, hogy bizonyos *Listeria monocytogenes* törzsek esetében némi eltérés tapasztalható a görbék lefutásában a tápközeg minőségének függvényében. Míg a CASO-levesben végzett kísérleteknél a redox-potenciál csökkenése egyenletesebbnek mondható, addig a tejben végzett méréseknél a hirtelen nagy redox-potenciál csökkenés figyelhető meg.

6. Összefoglalás

A *Listeria monocytogenes* élelmiszer-biztonsági szempontból nagyon jelentős, hiszen élelmiszerrel terjedő liszteriózisos megbetegedésekért felelős, amely évente számos halálesetet okoz világszerte. Kimutatását a hagyományos tenyésztési eljárások mellett ma már gyors, automatizált mikrobiológiai technikák segítségével is elvégezhetjük. Ilyen gyorsmódszer például a redox-potenciál mérő berendezés, amely a gyors mikrobiológiai eszközök közé tartozik. Segítségével, a fent említett faj élelmiszerben való jelenléte kimutatható. A készüléket a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Karának Fizika és Automatika Tanszékének munkatársai illetve a Szent István Egyetem Állatorvos Tudományi Karának munkatársai közösen fejlesztették ki.

Kísérleteim során, feladatul tűztem ki a *Listeria* nemzetség fajai illetve egyéb fajba tartozó mikroorganizmusok szaporodásának detektálását automata redox-potenciál mérő berendezéssel. Célom az volt, hogy eldönthessem, alkalmas-e ez a módszer illetve készülék a mért adatok alapján különbséget tenni a különböző fajok között az egyes fajok redox-potenciál görbéinek lefutása alapján.

Összehasonlítást végeztem feles CASO- levesben a *Listeria* nemzetség egyes fajai illetve más nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok között, továbbá a *Listeria* nemzetségen belüli fajok között. Megvizsgáltam *Listeria monocytogenes* különböző törzseinek feles CASO- levesben illetve tejben mért redox-potenciál görbéinek lefutását.

Eredményeim alapján, elmondható, hogy az alkalmazott műszerrel (MicroTester) és mérési módszerrel különbséget lehet tenni a különböző fajok között. Azonban a *Listeria* fajok redox-potenciál görbéjének lefutása alapján a *Listeria monocytogenes* és az egyéb *Listeria* fajok nem különíthetők el egymástól. Tejben illetve feles CASO-levesben mérve azt tapasztaltam, hogy a CASO -levesben végzett kísérleteknél egyenletesebb redox-potenciál csökkenés volt megfigyelhető, amíg a tejben végzett méréseknél a hirtelen nagy redox-potenciál csökkenés volt jellemző.

Véleményem szerint, további méréseket lehetne végezni laboratóriumi modell oldatokban és élelmiszerekben egyaránt még több különböző *Listeria* fajjal. Nagyobb számú vizsgálatok alapján pontosítani lehetne a különböző *Listeria* fajokra jellemző tipikus görbéket.

Irodalomjegyzék

- Adams M. R., Moss, M. O. 2008. Food Microbiology. RSC Publishing, University of Surrey Guildford, UK
- Aznar R., Elizaquível P. 2012. Reliability of *Listeria monocytogenes* Identification by Specific PCR Assessed by Phenotypic and Genotypic Techniques. Food Analytical Methods. 1(4): 243–251.
- Gnanou Besse, N., Barre, L., Buhariwalla, C., Vignaud, M.L., Khamissi, E., Decourseulles, E., Nirsimloo, M., Chelly, M., Kalmokoff, M. (2010) The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. International Journal of Food Microbiology. 136(3): 345– 351.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P., Frangeul, L., Amend, A., et al. 2003. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. FEMS Immunology and Medical Microbiology 35(3): 207-213.
- Carvalho, A., Eusébio, C., Silva, J., Gibbs, P., Teixeira, P. 2010. Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Control. 21(11): 1492– 1496.
- Deák, T., Kiskó, G., Maráz, A., Mohácsi-Farkas, Cs.. 2006. Élelmiszer-mikrobiológia, Mezőgazda Kiadó, Budapest, ISBN: 963 286 300 3
- den Bakker, H. C, Cummings, C. A, Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M. R., Wiedmann, M. 2010. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. BMC Genomics. 11 (1), art. no. 688
- Diez-Gonzalez, F., Belina, D., Labuza, T.P., Pal, A. (2007) Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* based on a time to detect model in culture media and frankfurters. International Journal of Food Microbiology. 113(3): 277– 283.
- Erdősi O., Szakmár, K., Reichart, O., Székely-Körmöczy, P., Laczay P. (2012) Application of the redox potential measurementbased rapid method in the microbial hygienic control. Acta Alimentaria.. 41(1): 45–55.
- Farkas, V. 2011. A hatóanyaggyártók megfelelőségének vizsgálata
- Fung D. Y.C. 1992. Historical developement of rapid methods and automation microbiology. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 1, 1, 1–14.

- Hellberg, R.S., Martin, K.G., Keys, A.L., Haney, C.J., Shen, Y., Smiley, R.D. 2013. 16S rRNA partial gene sequencing for the differentiation and molecular subtyping of *Listeria* species. *Food Microbiology*. 36 (2): 231-240.
- Jadhav, S., Bhawe, M., Palombo, E.A. 2012. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*. 88(3): 327– 341.
- Joźwiak, Á. 2009. A *Camphylobacterek* előfordulása az élelmiszerláncban, valamint a környezeti tényezők hatása túlélésükre és pusztulásukra, PhD értekezés, Szent István Egyetem, Állatorvos-Tudományi Doktori Iskola
- Juck, G., Neetoo, H., Beswick, E., Chen, H. 2012. Influence of prior growth conditions, pressure treatment parameters, and recovery conditions on the inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium* in turkey meat. *International Journal of Food Microbiology*. 153(1-2): 203– 211.
- Malacrinò, P., Zapparoli, G., Torriani, S., Dellaglio, F. 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*. 45(2): 127–134.
- McClure P.J., Beaumont, A.L., Sutherland, J. P., Roberts, T.A. 1997. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes* The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *International Journal of Food Microbiology*. 34(3): 221-232
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T. 2006. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*. 121(2): 157– 168.
- Miller, F.A., Ramos, B., Gil, M.M., Brandão, T.R.S., Teixeira, P., Silva, C.L.M. 2009. Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*. 133(1-2): 121– 128
- Milillo, S.R., Badamo, J.M., Wiedmann, M. 2009. Contributions to selected phenotypic characteristics of large species- and lineage-specific genomic regions in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 26(2): 212– 223.
- Mohácsi-Farkas, Cs., Kiskó G., Taczmann-Brückner, A., Rohonczy, K., Detection of *Listeria monocytogenes* by impedimetric method from raw vegetables, 2nd Central European Congress on Food 26-28. April, 2004, Book of Abstracts, pp. 222.
- Nufer U., Stephan, R., Tasara, T., 2007. Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7 °C. *Food Microbiology*. 24 (5): 444– 451.

- Orsi R. H., Bakker, H. C. D., Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*. 301(2): 79– 96.
- Otero, A., García-López, M.-L., Moreno, B. 1998. Rapid Microbiological Methods in Meat and Meat Products. *Meat Science*. 49(Suppl. 1): S179- S189.
- Pal, A., Labuza, T.P., Diez-Gonzalez, F. 2008. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurrie. *Food Microbiology*. 25(3): 460–470.
- Pishawikar, M.S., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. 1992. Rapid non-microbiological methods for detecting microorganisms in foods. *Trends in Food Science & Technology*. 3(C): 165-169.
- Rebuffo-Scheer C. A., Dietrich, J., Wenning, M., Scherer, S. 2008.. Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (6): 1629–1635.
- Reichart O, Szakmár, K., Jozwiak, Á., Felföldi, J., Baranyai, L. (2007) Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination. *International Journal of Food Microbiology*. 114(2): 143–148.
- Ryu, J., Park, S.H., Yeom, Y.S., Shrivastav, A., Lee, S.-H., Kim, Y.-R., Kim, H.-Y. 2013. Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control* 32 (2) 659- 664.
- Schleck,W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A. 1983. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, 308, 203–206.
- Schmid, M.W., Ng, E.Y.W., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H. 2005. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*. 28 (1): 1– 18.
- Szakmár Katalin Nádaskiné PhD. (2009) Redox– potenciál mérésen alapuló gyors mikrobiológiai módszer validiálása és ipari alkalmazhatóságának vizsgálata
- Yokoyama E., Y. Shibusawa, S. Maruyama, Y. Katsube, T. Mikami. 2005. Influence of bacteriocin-like substance, generation times, and genetic profiles of *Listeria innocua* on the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 28(3): 177– 186.

Internetes források:

www.msevens.com. 2013. *Listeria monocytogenes*. (2013. 10. 17)

<<http://www.msevens.com/cnsinfections/listeria.html>>

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek, dr. Kiskó Gabriellának és Engelhardt Teklának mindazon türelmükért és fáradozásukért, amelyet munkám során nyújtottak felém. Továbbá szeretném megköszönni a segítséget, amelyet dolgozatom elkészítése során kaptam, illetve azt, hogy bármilyen kérdéssel bizalommal fordulhattam mindkettőjükhöz.

Szeretnék köszönetet mondani a Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék munkatársainak, akik méréseim során segítséget nyújtottak számomra és hasznos tanácsokkal láttak el.