



***Escherichia coli* és *Listeria innocua* detektálása nyers növényi
alapanyagokból MALDI-TOF MS segítségével**

Plézer Éva

BUDAPEST

2023. május 3.

Tartalomjegyzés

1. Bevezetés	4
2. A munka célja	5
3. Irodalmi áttekintés	6
3.1 Zöldségfélék szerepe a táplálkozásban	6
3.1.1 A saláta táplálkozási jelentősége	7
3.2 Fejes saláta (<i>Lactuca sativa</i>) jellemzése	8
3.2.1 Fejes saláta morfológiája	8
3.3 Sótartalom hatása a fejessaláta fejlődésére	8
3.4 A víz szerepe a zöldségtermesztésben	9
3.5 Baktériumok akkumulációja a növényi részekben	9
3.6 <i>Escherichia coli</i> jellemzése	10
3.6.1 <i>Escherichia coli</i> fertőzés bemutatása.....	10
3.7 <i>Listeria monocytogenes</i> jellemzése	12
3.7.1 <i>Listeria monocytogenes</i> fertőzés bemutatása.....	13
3.8 Élelmiszerek tisztítása és fertőtlenítése	14
3.9 Baktériumok azonosítása MALDI-TOF MS segítségével.....	15
3.9.1 MALDI-TOF MS mérési módszertana.....	15
4. Anyag és módszer	17
4.1 Kísérlet beállítása.....	17
4.1.1 Saláta vetőmag eredete	17
4.2 Palántaföld eredete.....	17
4.3 Saláta vetése.....	17
4.4 Palánták nevelése	19
4.5 Palántaföld kezelése baktériumokkal fertőzött öntözővízzel.....	20
4.6 Növényekben előforduló <i>Listeria innocua</i> kimutatása.....	20
4.7 Növényekben előforduló <i>Escherichia coli</i> kimutatása	20
4.8 Vizsgálat menete.....	21
4.8.1 A salátalevelek tisztítása.....	21
4.8.2 Salátaminták feldolgozása	23
4.8.3 Lemosó folyadék kitenyésztése	26
4.9 Mikroszkópos vizsgálat	26
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	28

5.1 A növényi részekből kitenyészthető mikroorganizmusok eredményeinek bemutatása	28
5.2 Tisztítófolyadékból kitenyészthető mikroorganizmusok eredményei	34
5.3 Fluoreszcens mikroszkóp vizsgálati eredmények.....	34
5.4 <i>Escherichia coli</i> sejtszámának alakulása hajtásban és gyökérben a vizsgálati időszakban	35
5.5 <i>Listeria innocua</i> sejtszámának alakulása hajtásban és gyökérben a vizsgálati időszakban	36
5.6 MALDI-TOF MS vizsgálat eredményei.....	37
6. Összefoglalás	42
7. Köszönetnyilvánítás.....	44
8. Irodalmi hivatkozás	45

1.Bevezetés

A zöldségek és gyümölcsök fogyasztása sokban hozzájárul az egészséges életmód fenntartásához, a szervezetben oldott vitaminok, rostok, antioxidánsok révén.

A saláta (*Lactuca sativa*) a világon széles körben ismert és termesztett zöldségféle. A mindennapi ételek része, fogyasztják az egészséges életmód iránt elhivatottak, akik testtömegükből szeretnének csökkenteni, valamint magas vérnyomástól- és koleszterinszinttől szenvedők.

A „ready to eat” vagyis fogyasztásra kész ételek csoportba sorolt, saláta különlegességek bármely élelmiszerboltban könnyen beszerezhetők.

Az egyszerű termesztéstechnológiának köszönhetően konyhakertben is nevelhető növények esetében, a fogyasztáskor nem sokszor gondolunk bele, hogy milyen kórokozó, toxin, növény védőszer maradvány kerülhet a szervezetünkbe. A hőkezelés nélkül, legtöbbször csak vízzel leöblített saláta készítmények minden évben enterális eredetű megbetegedések és járványok forrásai. Ez a világon a betegségek leggyakoribb oka. A fejlett nyugati országok lakosságának is mintegy 10 %-a betegszik meg évente élelmiszerártalmak következtében.

A salátafogyasztás növekvő trendje tehát növeli a kockázatát az emésztőrendszeri megbetegedéseket okozó oportunistá kórokozó baktérium szervezetbe kerülésének. Ilyenek a *Clostridium*-, *Listeria*-, *Staphylococcus*-, mint Gram-pozitív-, és a *Campylobacter*-, *Enterobacter*- (benne *E. coli*), *Salmonella*-, *Yersinia*-, *Vibrio*-, mint Gram-negatív nemzetségek.

Ezek az emberi egészségre veszélyt jelentő baktériumok a vegetatív fázis bármely időszakában, a vetés kezdetétől, szennyezett öntözővízzel, betakarításig bármikor bekerülhetnek a növényi részekbe.

A kórokozók szervezetbe kerülése esetén az legnagyobb kockázati csoportot az idősek, immundeficiens emberek, terhes nők, kisgyerekek jelentik.

2. A munka célja

A munkám célja, hogy információt gyűjtssek a nyersen fogyasztott saláta növények mikrobiológiai kontaminációjáról, fejes saláta kísérletben.

A vizsgálat során a modellkísérletben, az öntözővízzel kijuttatott mikroorganizmusok kimutatására törekszem a következő nyolc hétben, a kísérleti növények különböző részeiből (hajtás, gyökérzet). A vizsgálatban *Escherichia coli* (ATCC 11775) és *Listeria innocua* (- *monocytogenes* modellezésére) (ATCC 33090) baktériumtörzsekkel történik az öntözővíz szennyezése.

Vizsgálni tervezem az egyszeri pontszennyezés időbeli hatását tenyészedény kísérletben. A kijuttatott mikroorganizmusok kitenyészhető élő sejtszámának időbeli alakulásán keresztül.

Kérdésként merül felül ugyanis, hogy az opportunistá patogén mikroorganizmusok, milyen mennyiségben inkubálódnak-, és hogyan alakul a térbeli eloszlásuk a növényekben. Van-e különbség a különböző növényi részek (hajtás-gyökér, új- illetve öreg hajtásrészek) szennyezettsége között?

A növényi szövetekből szelektív táptalajon kitenyésztett *Escherichia coli* és *Listeria innocua* telepeket Matrix Asszisztált Lézer Deszorpció és Ionizációs tömegspektrométer (MALDI-TOF MS) segítségével tervezem azonosítani, annak megerősítésére, hogy a növényi részekből kitenyésztett izolátumok valóban a kezelésben felhasznált oltóanyag törzsek voltak.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Zöldségfélék szerepe a táplálkozásban

A zöldségfélék lágy szárú, intenzív művelést kívánó, nyersen vagy feldolgozva emberi táplálékul szolgáló, nagy biológiai értékű, sok vitamint, ásványi sót, íz- és zamatanyagot tartalmazó növények (*Balázs és munkatársai, 1994*).

Epidemiológiai vizsgálatok összefüggést mutattak ki a megnövekedett zöldségfogyasztás és a krónikus betegségek, például a rák, a szív- és érrendszeri betegségek és az életkorral összefüggő funkcionális hanyatlás csökkent kockázata között (*Kim és munkatársai, 2016*).

A rosttartalom egy része ballasztanyagként jelenik meg a tápcsatornában, a cellulózszármazékokat tartalmazó vegyületeik miatt. Táplálkozásélettani jelentősége igen nagy, főként a kisebb fizikai igénybevételű társadalmakban, mivel a kevesebb mozgás a bélcsatorna gyengébb működését eredményezi, ezáltal az emésztés lelassulását is egyben. A salakanyagok rendszeres kiürülése alapvető jelentőségű az emberi szervezetben, másként a mérgeanyagok egy része bekerülhet a véráramba (*Hájos, 2020*). Az emberi szervezet megfelelő funkcionálásához elengedhetetlen fontossággal bír az elegendő élelmi rost fogyasztása (*Panyor és Hipszki, 2022*). Zsírtartalmuk nem jelentős, így a zöldségnövények fogyasztása a diétás táplálkozás fontos eleme lehet. A lebontás során hamujuk lúgos kémhatású, amely a savas kémhatású cereáliák és húsok közömbösítésére kiváló. A nagyobb arányú zöldség fogyasztást indokolja, hogy a magyar lakosság táplálkozásában többnyire mérsékelt a rost és az ásványi elem bevitel.

Bioaktív anyagokban gazdagok, pl. kapszaicin, allicin, likopin, szulforafán, melyek gyógyászati jelentősége kiemelkedő. A természetes forrásból származó vegyületek jelenléte az oxigénből származó szabadgyökök megkötésére kiválóan alkalmas. Táplálkozásunkban igen fontos a hatékony védekező rendszer kiépítése, hogy a betegségek kialakulását megelőzhessük. Ebben a zöldségfélék szerepe kiemelt jelentőségű, mint antioxidáns enzimek, különböző vitaminok, folsav, színyanyagok stb. forrásai. Ezen túlmenően kiváló íz- és zamatanyag források. Előfordulhat, hogy káros anyagokat halmoznak fel (pl. nitrát, oxálsav), azonban a megfelelő termesztési mód és fajta alkalmazásával ez jelentősen csökkenthető (*Hájos, 2020*).

Az egészséges táplálkozás kialakításához a különféle élelmiszereket és folyadékokat megfelelő arányban, mennyiségben és változatosan kell fogyasztani. Az élelmiszer mennyiségét befolyásolja a napi energiaszükséglet, amely függ a nemtől, az életkortól, az aktuális testtömegetől, a sportolási szokásoktól és a napi fizikai tevékenységtől (*Pfau és*

munkatársai, 2018). Hazánkban a zöldségfogyasztás közepes szintű, az ezredforduló óta 100 kg/fő/év, éves eloszlása egyenlőtlen. A fogyasztás időszakának eloszlásának 50 %-a nyár végére, őszi elejére tehető (kb. 4 hónap), míg januártól áprilisig évtrendi aránya igen alacsony. További problémát jelent a termékszerkezet (faj szortiment), ami a fogyasztás egysíkúságát okozza. Az elfogyasztott zöldség 2/3-a 10 növényfajból áll, ezen belül is 5 faj (fejes káposzta, paradicsom, paprika, görögdinnye, vöröshagyma) képezi az összes elfogyasztott zöldségnövények 50 %-át, míg a maradék 3/4-ed része uborka, sárgarépa, petrezselyem, zöldborsó, zöldbab.

A levélzöldségek táplálkozás-élettani jelentőségüket tekintve megfelelnek a korszerű követelményeknek, mivel a rosttartalmuk és ásványi-anyag tartalmuk nagy (főként Fe és Mg), így kedvező az évtrendi hatásuk. Energia tartalmuk kicsi, könnyen emészthetők, ezáltal fogyókúrás étrendekbe is jól beilleszthetők. Színes leveleikkel dekoratívak, ezáltal hidegtálak díszítésére is alkalmasak (*Hájos, 2020*).

3.1.1 A saláta táplálkozási jelentősége

Táplálkozási jelentősége nem elsősorban vitamin- vagy ásványianyag-tartalmában, hanem a téli, kora tavaszi szegényes zöldségválaszték bővítésében rejlik. Az eltérő ültetési időpontok miatt más fény- és hőmérsékleti körülmények között termesztik, ennek megfelelően a levelekben eltérő az emberi szervezet számára fontos A1-, B1-, C- és E-vitaminok mennyisége. A késő tavaszi, nyári fajták többszörös mennyiségben tartalmaznak C-vitamint, az üvegházakban vagy a fólia alatt télen hajtattott fajtákhoz képest. A fejes saláta ásványianyag-tartalma - a többi levélzöldségféléhez hasonlóan - nagy, különösen mészben, vasba és foszforban. Ezek mennyisége - szemben a vitaminokkal - kisebb mértékben változik, a fénytől és a hőmérséklettől függően, így ezekben az anyagokban a téli időszakban termesztett saláta is viszonylag gazdag (*Hájos, 2020*).

A saláta jelentős mennyiségű vízben oldódó antioxidánst tartalmaz, mint a C-vitamin és a különféle fenolos vegyületek (fenolsavak, antocianidinek), valamint a lipidben oldódó antioxidánsok, például a lutein vagy a tokoferolok. Feltételezték, hogy a saláta fogyasztása javítja mind a lipoprotein profilt, mind az antioxidáns állapotot, ami kardiovaszkuláris védő hatást eredményez (*Nicolle és munkatársai, 2004*).

3.2 Fejes saláta (*Lactuca sativa*) jellemzése

Magyarországon a legutóbbi időkig a saláta alatt a halványzöld színű fejes salátát értette a köznyelv. Az elmúlt években, követve a salátafogyasztási trendeket, különböző fajták széles választéka szerezhető be kereskedelmi forgalomból.

A fejes saláta a legrégebben ismert és termesztett, Európában és Magyarországon a legelterjedtebben fogyasztott salátafaj. Egykoron primőr terméknek számított, az első szedéseket többnyire a húsvéti időszakra időzítették. Hazánkban napjainkra idényzöldségből egész évben termesztett áruvá vált, többféle termesztési módja és sok fajtatípusa miatt egész évben fogyasztható friss állapotban. Több száz különböző változata létezik, különbség leginkább formájukban, színükben, mintsem ízükben rejlik. A különböző fejes saláták színe a világos zöldtől egészen a sötét liláig terjedhet, úgynevezett zöld ízűk van, jellemzően kicsit kesernyés (*Bíró és munkatársai, 2016*). Viszonylag rövid (10-14 hét) élettikusú növény (*Pink és Keane, 1993*).

3.2.1 Fejes saláta morfológiája

A *Lactuca sativa* egygyári növény, vékony csapgyökérrel, felálló, felső részén elágazó szárral. A levelek spirálisan helyezkednek el, rozettát vagy fejet alkotnak. Alakjuk hosszúkástól haránt ellipszisig, kör alakútól háromszögig terjedő, osztatlan szögletesig terjed. A levél széle egésztől fogazottig terjed, gyakran göndör. A szár levelei hosszúkásak, elliptikusak, szív alakúak. (*Křístková és munkatársai, 2008*)

3.3. Sótartalom hatása a fejessaláta fejlődésére

A saláta az egyik leggyakrabban használt saláta zöldség, és viszonylag sóérzékeny növénynek tartják. A sótartalom az Egyesült Államok valamennyi fontos salátatermesztő régiójában a növénytermesztés egyik fő korlátja, és a vízminőségi problémát tovább súlyosbítja az éghajlatváltozás. A sótartalom a növényekre gyakorolt hatásai közé tartozik a celluláris vízhiány, az iontoxicitás, a tápanyaghiányok és az oxidatív stressz, amelyek növekedési gátláshoz, molekuláris károsodáshoz és akár növény pusztulásához is vezethetnek. A talaj magas sótartalma az alsó levelek víz tartalmának csökkenését, a sztóma bezáródását és a sejt turgor nyomásának és expanziójának elvesztését eredményezi, ami csökkenti a fotoszintetikus sebességet és a levélfelületet (*Xu és Mou, 2015*), illetve, ami csökkenti a növényi biomasszát, továbbá a levelek égését és korai öregedését okozza (*Adhikari és munkatársai, 2019*).

3. 4 A víz szerepe a zöldségtermesztésben

A zöldségfélék friss tömegének mintegy 90%-át a víz teszi ki, és minden életfolyamatnak alapfeltétele a víz jelenléte. A vizet túlnyomórészt a gyökerek veszik fel a talajból, de más növényrészek is képesek vízfelvétele. A növények vízellátottságát környezetük függvényében vizsgálhatjuk, mert az függ a levegő víztartalmától és a gyökérszóna vízszolgáltató képességétől. Ezeket pedig befolyásolja sok egyéb környezeti tényező is, különösen pedig a fény és a hőmérséklet (*Balázs és munkatársai, 1994*).

3.5 Baktériumok akkumulációja a növényi részekben

A friss zöldségtermékek élelmiszer eredetű kórokozókval történő kontaminációja aggodalomra ad okot, mivel ezek a termékek minimális feldolgozáson esnek át, vagy nyersen fogyasztandók (*Boodram és munkatársai, 2022*).

Az elmúlt években, egyre gyakrabban izoláltak *Escherichia coli* O157:H7-et friss saláta termékek mellett, babcsírából, sárgadinnyéből, almából. A mechanizmus, amely révén a mikroba bekerül a növénybe, nem teljesen ismert. Az egyik hipotézis szerint a növény akkor fertőződik, ha a termesztés során nem megfelelően kezelt trágyával trágyázott földeken termesztik (*Beuchat, 1999*).

Az *E. coli* O157:H7 baktérium behurcolásának egy másik módja a szarvasmarha ürülékkel szennyezett vízzel való öntözés vagy a szennyezett felszíni vízfolyással való érintkezés (*Ackers és munkatársai, 1998*).

A közelmúltban számos *E. coli* O157:H7 kitörést hoztak összefüggésbe a szennyezett vízzel kapcsolatosan (*CDC, 1999*).

Továbbá tanulmányok kimutatták, hogy a kórokozó képes hosszabb ideig túlélni a vízben (*Chalmers és munkatársai, 2000*).

A salátatermesztési gyakorlatok általában tartalmaznak egy öblítési lépést, amelynek során a leveleket 100-200 ppm szabad klórt tartalmazó csapvízzel fertőtlenítik (*Beuchat és munkatársai, 1998*). Ez a klórtartalom bizonyítottan csak csekély mértékben csökkenti az *E. coli* O157:H7-t a salátaszövetek felületén (*Solomon és munkatársai, 2002*).

Solomon és munkatársai (2002) megvizsgálták, hogy az *E. coli* O157:H7 szennyezett trágyával vagy öntöző vízzel érintkező gyökérrendszerből is átjuthat a növényi érrendszeren keresztül az ehető részekbe. Ebben a tanulmányban, kimutatták az *E. coli* O157:H7 átvitelét a salátanövényekre a talajba került szennyezett trágyából, továbbá szennyezett vízzel történő árasztásával.

3.6 *Escherichia coli* jellemzése

Az *Escherichia coli* az *Enterobacteriaceae* családba tartozik. Gram-negatív, 1-5 µm nagyságú, spórát nem képező pálcá alakú baktérium. Fakultatív anaerob, a gyakorlatban aerob módon tenyésztjük. Könnyen tenyészthető mikroba, általános táptalajon jól szaporodik, az epesavakkal szemben érzékeny. Az emberi és állati bélcsatornában szinte mindig megtalálható a normál flóra részeként. Képes laktóz bontására. „O”, „K” és „H” antigénekkal egyaránt rendelkezik, bár egyes törzsek lehetnek tok- és csillómentesek is.

Nem teljesen ismert, hogy milyen tulajdonságaik, faktorok alapján lesznek az *E. coli* törzsek már órákkal a születés után részei a vastagbél normál flórájának. Egyes törzsek permanensen megtapadnak, míg mások csak átmenetileg mutathatóak ki a béltartalomban. Feltehetően különböző adhezineknek, illetve olyan metabolikus képességnek lehet ebben szerepe, mely a vastagbél flórában meglévő óriási vetélkedés mellett biztosítja e törzsek megtapadását és táplálékhoz jutását. Általában az *Escherichia coli* törzsek betegséget, csak súlyosan immunkompromitált betegekben okoznak. Enterohaemorrhagiás (EHEC) *E. coli*-t a nyolcvanas évek elején izoláltak először nem kellően átsütött hamburger által okozott hasmenéses járványokban (*Arthur és munkatársai, 2004*). Önmagában a Shiga toxin termelést több, mint száz *E. coli* szerotípuson belül leírtak, az esetek többségében ezek a törzsek feltehetően az adhézió hiánya miatt nem okoznak emberi betegséget (ezeket Shiga toxin termelő, STEC törzseknek nevezzük). A felnőtt állatok (leggyakrabban szarvasmarha, kecske, juh) bélcsatornájában a STEC és EHEC törzsek gyakorta megtalálhatóak, ott tüneteket nem okoznak. Az emberi fertőzések egyik gyakori módja a széklettel szennyezett (pl. vágóhídi feldolgozás során), nem kellően hőkezelt élelmiszer fogyasztása, tehát a fertőzés joggal tekinthető zoonózisnak. Emellett ivóvíz, fertőzött vízzel öntözött zöldség, gyümölcs konzervek is terjeszthetik az EHEC-et. Az alacsony fertőző dózis (kb. 1000 csíra) magyarázza, hogy közvetlen emberi vagy állati kontaktus (állatok simogatása), sőt, egyes feltételezések szerint akár levegő útján való átvitel is felelős lehet a terjedésért (*Pál, 2013*).

3.6.1 *Escherichia coli* fertőzés bemutatása

A fejes saláta (*Lactuca sativa*) az 1973 és 1997 között az Egyesült Államokban az élelmiszer eredetű megbetegedésekben leggyakrabban érintett friss termékek közé tartozott. Az *Escherichia coli* O157:H7 a leggyakoribb bakteriális kórokozó az ezzel az árucikkal és más leveles zöldségfélékkel összefüggésbe hozott járványkitörésekben.

Nagyobb populációméretet ért el a fiatal leveleken, mint a középső leveleken, érett salátafejekből betakarított leveleken, ami arra utal, hogy a levelek kora befolyásolja a betakarítás előtti és a betakarítás utáni állapotot.

Ercolani és társai kimutatták, hogy az *E. coli* és a *Salmonella enterica serovar Typhimurium* túlélte a szántóföldön a fejes saláta teljes vegetációs időszaka alatt, egészen a betakarításig. *Islam és munkatársai* újabb vizsgálatai bizonyították, hogy az *E. coli O157:H7* és a *Salmonella serovar Typhimurium* fennmaradhat a saláta- és petrezselyemnövényeken a szántóföldi termesztésben a fiatal palánták szennyezett trágyával vagy öntözővízzel történő beoltásától kezdve, egészen néhány nappal azután, hogy betakarították (*Brandl és Amundson, 2008*).

A salátalevelű zöldségek zoonózisos kórokozókkal való szennyeződésének átviteli útvonalai közé tartozik a hajtások kelése a nem megfelelően komposztált állati hulladékokon, valamint a levelekre eső csapadék, valamint az öntözés vagy a szennyezett vízzel való elárasztás. A rovarok által okozott károk természetes sebnyílásokat biztosítanak, míg a fitopatogének által okozott károsodás elősegítheti az *E. coli O157* kolonizációját azáltal, hogy veszélyezteti a növény természetes védekező mechanizmusait és megköti az antimikrobiális vegyületeket (*Quilliam és munkatársai, 2012*).

Az organizmus a hőmérséklettől függően több hétig is életben maradhat ioncserélt vízben és tóvízben. Feltételezések szerint a salátaföldek öntözésére használt szennyezett víz volt a forrása az *E. coli O157:H7* fertőzés több állapotú kitörésének, amely a mesclun saláta fogyasztásával kapcsolatos 1996-ban (*Islam és munkatársai, 2004*).

A betakarítás előtti termelés során az *E. coli* fertőzés lehetséges forrásai a következők: rossz dolgozói higiénia, állatok behatolása és székletürítés a termőföldekre; komposztálatlan vagy kezeletlen trágya használata; szennyezett öntözővíz használata és szennyezett berendezések használata.

Mivel a salátát névleges előkészítéssel fogyasztják, a növényi kórokozók elleni védekezés a szántóföldi peszticidekkel, valamint a zoonózisok elleni védekezésre korlátozódik. Nyilvánvaló, hogy a fogyasztásra kész salátanövények bélben oldódó baktériumok általi endofita kolonizációja fontos közegészségügyi következményekkel jár.

A levelek epifita fertőzésével ellentétben az internalizált baktériumokat nem lehet könnyen lemosni vagy fertőtlenítőszerrel kezelni és még a bélbe való átjutást is elősegíthetik.

A bélben oldódó baktériumok azon képességét, hogy aktívan kolonizáljanak számos mezőgazdasági szempontból fontos növényt, csak meglehetősen nemrégiben ismerték fel, mint egy jelentős közegészségügyi problémát. Korábban azt gondolták, hogy a növények

humán kórokozó baktériumokkal, például *E. coli* O157-tel és *Salmonella*-val való a levélfelületek passzív szennyeződése, pl. eső fröccsenése vagy öntözővíz hatására következik be. Azonban egyre több kutatási eredmény mutatott rá arra, hogy a bélben oldódó baktériumok olyan molekuláris és fiziológiai mechanizmusokkal rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy sikeresen megtelepedjenek és túléljenek a növényi környezetben. *Quilliam és munkatársai* a tanulmányban kimutatták, hogy a saláta *E. coli* O157 kolonizációjának lehetősége saláta fajta függő. Az internalizálódott vagy nagyon erősen a levélhez tapadt *E. coli* O157 metabolikus aktivitása sokkal nagyobb volt, mint a levél felszínén lévő sejteké, ami arra utal, hogy ezek a sejtek nem csak túlélnek ebben a környezetben, hanem aktívan metabolizálják a növényi eredetű tápanyagokat. Ezenkívül a saláta fajta *E. coli* O157 aktivitására gyakorolt hatása a gyökérszónában is nyilvánvaló volt, amit olyan fajtaspecifikus tényezők közvetíthetnek, mint a gyökérváladék és a mikrobiális közösségek különbségei

A bakteriális endofiták bejutásának módjai közé tartoznak a gyökér-, és a levélfelületről közvetlen behatolás, és a szennyezett talajon történő magok kikelését követően keresztül is (*Quilliam és munkatársai, 2012*).

3.7 *Listeria monocytogenes* jellemzése

A *Listeria monocytogenes* egy Gram-pozitív, rövid (0,5-2 μm) hosszúságú, fakultatív anaerob pálcá alakú baktérium. Peritrich csiliókkal rendelkezik, de mozgása hőmérsékletfüggő: elsősorban szobahőn kifejezett, motilitását 37 °C-on elveszíti. Széles hőmérsékleti skálán (1 °C-tól 45 °C fokig), képes szaporodni és halotróf (magas sókoncentrációt is elviseli). A pasztörizálás elpusztítja. A *L. monocytogenes*nek mintegy tucatnyi szerotípusa ismert, a legtöbb humán fertőzést a 4b típus okozza.

A kórokozó az esetek döntő többségében kontaminált élelmiszerrel, orális fertőzés révén kerül a szervezetbe. Ennek ellenére a fertőzések többsége szisztémás jellegű, vagyis az egész szervezetet érintő betegség.

A kontaminált élelmiszer-fogyasztását követően egészséges immunrendszerrel rendelkező felnőttekben a fertőzés általában tünetmentes vagy influenza-szerű, esetleg enyhe gasztrointesztinális tünetekkel jár. A fertőzése után maradhat fent tünetmentes ürítés. Idősekben, immunszuppresszáltakban azonban az alimentáris expozíció, akár gastrointesztinális tünetek nélkül, gyakran vezet szisztémás fertőzéshez, melynek leggyakoribb megnyilvánulási formái a meningitis és a szepszis. A tünetek nem különböznek egyéb bakteriális meningitis, szisztémás fertőzés tüneteitől, de ilyen betegek

esetén mindig fel kell, hogy merüljön *L. monocytogenes* lehetséges etiológiai szerepének gondolata. Ez fordítva is igaz: a kórokozó szisztémás fertőzésből történő izolálása fel kell, hogy vesse egy, a háttérben lévő immunokompromittáló betegség lehetőségét. A ritkábban előforduló manifesztációk az ízületi gyulladások és a hepatitis.

A terhes anyák szintén fokozottan érzékenyek a fertőzéssel szemben. Az étellel történő fertőzés után általában náluk is viszonylag enyhe tünetek jelentkeznek: hidegrázás, láz, torokgyulladás, fejfájás, esetleg hasmenés, de előfordulnak tünetmentes esetek is. A fertőzés átterjedhet a magzatra is, aminek magzatelhalás, abortusz, koraszülés lehet a következménye. Az újszülöttek listeriosisa létrejöhet a méhen belül történő fertőzés eredményeként. Ilyenkor a tünetek a szülést követően 48 órán belül nyilvánvalóak, ez a korai újszülöttkori listeriosis. Az újszülött fertőződhet az élet első napjaiban is, melyben a fertőzés forrása az anya, illetve az ellátó egészségügyi személyzet. A tünetek a születés utáni első hetekben jelentkeznek elsősorban meningitis, szepszis formájában. Ezt nevezik késői újszülöttkori listeriosisnak (Pál, 2013)

3.7.1 *Listeria monocytogenes* fertőzés bemutatása

A baktérium szennyezés forrásai közé tartozik a fertőzött ember és az állatok, a trágya, a komposzt és az öntözővíz.

A saláta *L. monocytogenes*-szel történő szennyeződése után a baktériumok képesek megtapadni a növény leveleinek felületén, túlélni és szaporodni is képes a növényben, de a saláta *Listeria* általi kolonizációjára csak korlátozott figyelem irányul.

A *Listeria monocytogenes* egy Gram-pozitív baktérium, amely részt vett a salátával kapcsolatos élelmiszer eredetű járványkitörésekben és visszahívásokban. A *L. monocytogenes* egy mindenütt jelenlévő baktérium, amely különböző környezetekben, például talajban, növényekben, vízben és élelmiszer feldolgozó környezetben is megtalálható. A *L. monocytogenes*nek nagyon jó azon képessége, hogy széles hőmérsékleti tartományban boldoguljon és hogy túléljen anaerob körülmények között (NicAogáin és O'Byrne, 2016).

Élelmiszer eredetű járvány 2011-ben fordult elő az Egyesült Államokban, ahol a járványhoz kapcsolódó négy *L. monocytogenes* törzset egész sárgadinnyére és csomagolóberendezésekre vezették vissza a coloradói Jensen Farms-on, így 147 ember fertőződött meg és 33 ember halálát okozta.

A baktérium fertőzött salátától 19 ember betegedett meg, egy ember pedig meghalt abban a járványban, amely 2015 és 2016 között, egy évig az Egyesült Államok kilenc különböző

államában volt jelen. A forrás egy feldolgozó létesítményhez kapcsolódott Springfieldben, Ohio államban.

Új-Zéland legnagyobb salátagyártója 2017 márciusában minden termékét visszahívta, mivel az általa termelt salátáról vett minta pozitívitást mutatott.

A salátán kívül más leveles zöldségeket és fogyasztásra kész zöldségeket is összefüggésbe hoztak a *L. monocytogenes* kitöréseivel és visszahívásaival (Kyere és munkatársai, 2018).

A *Listeria monocytogenes* különböző körülmények között képes túlélni és fennmaradni a saláta leveleinek felületén (Poimenidou és munkatársai, 2016).

Beuchat és Brackett (1990) kimutatta, hogy a *L. monocytogenes* képes növekedni és szaporodni módosított atmoszférában (3% O₂ és 97% N₂) tárolt salátán is.

3.8 Élelmiszerek tisztítása és fertőtlenítése

A mosás során fellépő fizikai erők hatással vannak a növény felszínéről eltávolított mikroorganizmusok mennyiségére. Kimutatták, hogy a klór hozzáadása a mosóvízhez csökkenti a kórokozók populációját a nyers zöldségeken, és ez a legköltséghatékonyabb módszernek bizonyult a növényi anyagok mikrobaterhelésének csökkentésére (Adams és munkatársai, 1989), de a hozzátapadt kórokozók teljes kiküszöbölését nem lehet biztosítani (Beuchat, 1998). Sok frissterméket gyártó iparág hozzávetőlegesen 20-200 ppm klórkoncentrációt használ 6,0 és 7,5 közötti pH-értékkel 1-2 percig az alapanyagok mosásához használt víz fertőtlenítésére, a keresztszennyeződés elkerülése érdekében (Beuchat, 1998).

Zhang és Faber (1996) megfigyelte, hogy a *L. monocytogenes* csökkenése frissen vágott salátán, amelyet 200 ppm 9,31 pH-s klórral 10 percig, 22 °C-on kezeltek a 9,3 log CFU g⁻¹ a kiindulási populáció volt, amely a vizsgálat végére 1,7 log CFU g⁻¹ lett.

Brackett (1987) in vitro kísérletei kimutatták, hogy a klór *L. monocytogenes* elleni hatása elsősorban az expozíció első 30 másodpercében jelentkezik.

Számos tanulmány alkalmazta friss termékek fertőtlenítőszerként az ózont. Aprított salátán az ózon (3 ppm) a *L. monocytogenes* mennyiségét, 21 °C-on, 5 perces kezelés után 6,0 log CFU g⁻¹ -ra csökkentette (Kyere és munkatársai, 2018).

3.9 Baktériumok azonosítása MALDI-TOF MS segítségével

A tömegspektrometria a különböző vegyületek tömeg/töltés arányának elemzésére használt analitikai technika. Különböző ionizációs és detektáló rendszereken alapuló technikákat fejlesztettek ki. A biomolekulák elemzésére a mai napig legszélesebb körben használt módszer a mátrix-asszisztált lézeres deszorpció/repülési idő ionizációs tömegspektrometria (MALDI-TOF MS).

A technika kristályba ágyazott minta rövid lézerimpulzusokkal történő ionizálásán alapul. Az ionokat felgyorsítják, és vákuum alatt a repülési idejük alapján szétválasztják.

A mikrobiológiai diagnosztikában kevés fejlesztés volt olyan gyors hatással a mikroorganizmusok fajszerű azonosítására, mint a MALDI-TOF MS készülék. A hagyományos megkülönböztetési módszerek biokémiai kritériumokon alapulnak, és további előzetes tesztelést és hosszadalmas inkubációs eljárásokat igényelnek. Összehasonlításképpen, a MALDI-TOF MS percekben belül képes azonosítani a baktériumokat és az élesztőket közvetlenül a táptalajon kinőtt telepekből. Ez gyökeresen új, módszeresen egyszerű megközelítés jelentősen csökkenti a fogyóeszközök költségeit és a diagnosztikára fordított időt (*Wieser és munkatársai, 2012*)

3.9.1 MALDI-TOF MS mérési módszertana

A vizsgálat során kis mennyiségű mikrobiális biomasszára van szükség az azonosításhoz. A megfelelő vákuum létrehozása után az egyes mintákat rövid lézerimpulzusoknak teszik ki. A lézer energiája elpárologtatja a mikroorganizmust a mátrixszal együtt, ami a peptidok és fehérjék ionizációjához vezet. Az elektromágneses mező felgyorsítja az ionokat, mielőtt azok belépnének a repülési csőbe. Pontosán megméri azt a repülési időt (TOF), ameddig az analitok eljutnak a repülési cső végén lévő detektorhoz. Az ionizáció mértéke, valamint a fehérjék tömege határozza meg az egyéni TOF-ot. Ezen TOF információ alapján rögzítésre kerül egy jellemző tömegspektrum, amely egy adott minta egyedi ujjlenyomatát képezi, ami faji bélyeg.

A fajszerű azonosításhoz a vizsgált tömegtartomány 2 és 20 kDa között alakul. Ez az intervallum, viszonylag stabil és erős jel/zaj aránnyal rendelkezik. Érdekes módon ebben a tömegtartományban a riboszómális fehérjék dominálnak, amelyek jól ionizálódnak, pontos spektrumot adnak, és csak minimálisan befolyásolják a mikrobiális növekedési körülmények.

Számítógépes szoftver segítségével összehasonlítjuk az összegyűjtött spektrumokat egy referenciabázissal, amely orvosilag releváns izolátumok széles választékát tartalmazza.

A mért spektrumok a módszerből eredő zajnak vannak kitéve, ezért soha nem lesznek teljesen azonosak az egyes izolátumok esetében. A spektrumokat összehasonlító szoftver a megfigyelt és tárolt adatsorok hasonlóságai alapján számértéket (pontértéket) állít elő, ami az eredmény megbízhatóságára reflektál (*Wieser és munkatársai, 2012*).

4. Anyag és módszer

4.1 Kísérlet beállítása

A kísérletet 12 hétre terveztem fényszobában, amihez Humil nevezetű saláta (*Lactuca sativa L. var. Capitata*) fajtát vetettem. Összesen 6 ültető ládába történt a vetés, amelyekből 2 db ládában *Escherichia coli*, 2 db ládában *Listeria innocua* törzssel történt a fertőzés. Az utolsó két ládában pedig a kontroll növényeket vettem, amelyekre sem *E. coli*, sem *Listeria innocua* törzsekkel nem lettek befertőzve a saláták.

4.1.1 Saláta vetőmag eredete

A RÉDEI KERTIMAG - Vetőmagkereskedelmi Zrt. Humil nevezetű áttelelő, extra korai salátáját (*Lactuca sativa L. var. Capitata*) vettem el. Ezt a saláta fajtát azoknak ajánlják, akik már kora tavasszal szeretnék salátát fogyasztani, mivel áttelelő. A szabadföldi vetés optimális időpontja november első felétől, március végéig tart. Szabadföldön, nyáron 25°C felett nem csírázóképes, ezért érdemes nedvesebb, hűvösebb helyre vetni. Vetésmélységnek 0,5 cm javasolt. Levelei halványzöldek, enyhén fodrosak, erős és szép fejet képeznek ([http1](#)).

4.2 Palántaföld eredete

A vetéshez 50l-es FLORIMO Palántaföldet használtam. Magvetésre, tűzdelésre és palántanevelésre használható természetű közegként.

Komponensei: sávolyi tőzeg, litván (*sphagnum* moha) tőzeg, komposztált marhatrágya, agyag és folyami homok.

Előírt minőségi feltételei: pH $6,5 \pm 0,5$, szervesanyag tartalom (m/m%) sz.a.: legalább 40; Nitrogén (N) tartalom (m/m% sz.a.: legalább 0,3, Foszfor (P_2O_5) tartalom (m/m%) sz.a.: legalább 0,1, Kálium (K_2O) tartalom (m/m%) sz.a.: legalább 0,1 ([http2](#)).

4.3 Saláta vetése

Az Agrárkörnyezettani tanszéken, 6 db műanyag ládába kimértem 3 kg FLORIMO palántaföldet. Megöntöztem desztillált vízzel, majd kicsit tömörítettem, végül kb. 0,5 cm mély, egymástól egyforma távolságú lyukakat fúrtam a talajba és abba vettem el a salátamagokat. Minden egyes lyukba 3-3 db vetőmagot tettem, majd betakartam talajjal, és szórófejes öntözőkannával meglocsoltam, hogy megfelelőek legyenek a csírázási körülmények. A ládák tetejét fátyolfóliával fedtem le, hogy a kiszáradást

megakadályozzam. Ezt követően a palánta ládákat elhelyeztem a fényszobában, ahol 16°C-ot és 44x100-as erősségű fényforrást állítottunk be.



1. ábra: Fátyolfóliával takart vetőládák



2. ábra: Kikelt saláták

4.4 Palánták nevelése

A saláták talajának öntözését heti két alkalommal végeztem. Az öntözővíz mennyiségének megállapításához IR30 automatikus nedvesség meghatározó készüléket használtam. A gép fedőjében lévő reflektor alatt két speciális formájú infravörös sötétsugárzó melegíti a mintákat egyenletesen. A mintatérben épített ellenállás hőmérő által szolgáltatott jel segítségével vezérli az elektronika a hőmérséklet szabályozását (*IR-30 Automatikus nedvesség meghatározó készülék- Használati utasítás*).

1g talajt bemértem analitikai mérlegen, majd alufóliára helyezve, a nedvességmérő gépet tárázva behelyeztem, és a tetejét lecsukva elindítottam a mérést. A kapott nedvességtartalomból egyenes arányossággal kiszámoltam, a szükséges öntözővíz mennyiségét, hogy 60 %-os nedvességtartalmat érjek el talajban.



3. ábra: Pontosán bemért talaj



4. ábra: A bemért talajok nedvességének meghatározása IR-30-as készülékkel

4.5 Palántaföld kezelése baktériumokkal fertőzött öntözővízzel

Az első négy hétben nem történt szennyezett öntözővízzel locsolás. A talajok nedvességtartalmának mérése után, az Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszéken megfelelő mennyiségű steril desztillált vizet használtam hígítófolyadék és öntözővíz előállítására céljából. Hígítófolyadéknak azért használtam steril desztillált vizet, mert nem akartam előidézni a növények esetleges sókárosodását.

Az öntözővíz beszennyezéséhez *Escherichia coli* és *Listeria innocua* tisztatenyészeteket készítettem, majd a táptalajok felszínéről a sejteket az öntözővízbe belemostam.

A kiindulási sejtkoncentrációkat McFarland denzitométer (BIOSAN DEN-1B) segítségével állítottam be. Az öntözővíz baktérium koncentrációja 10^6 -on volt. A mikrobákat az öntözővíz segítségével juttattam ki.

4.6 Növényekben előforduló *Listeria innocua* kimutatása

A kísérlethez *Listeria monocytogenes* modellezésére, *Listeria innocua*-t használtam. A választás azért esett erre a fajra, mert nagyon hasonló az élelmiszer eredetű kórokozó rokonához, de nem humán patogén jellegű baktérium, illetve 16S rRNS-el nem lehet elkülöníteni a két fajt. Széles körben megtalálható a környezetben és az élelmiszerforrásokban is. Szélsőséges pH-értékű tápközegben, illetve hőmérsékleten és sókoncentrációban is képes túlélni. A *L. monocytogenes*hez hasonlóan pálcika alakú, Gram-pozitív, fakultatívan anaerob, nem spóráképző baktérium (*http3*). Ez a törzs használható minőség-ellenőrzési vizsgálatokba vagy indikátortörzsként is (*http4*).

Listeria kimutatásához a HAL002-es Harlequin™ *Listeria* Medium táptalajt használtam, amely szelektív identifikáló táptalaj *Listeria spp.* azonosítására élelmiszer és klinikai mintákból. Az eszulin hidrolízist felváltja egy újszerű színreakció, amely a CHE-glükózid és vastartalmú glükonát jelenlétén alapul. A reakció eredményeként intenzív fekete színű telepeket képez a *Listeria*, a fekete szín csak a telepekben koncentrálódik, ezért a tiszta agar felszínen könnyű azonosítani más gyanús telepeket. Lítium-klorid tartalma gátolja az *Enterococcus*-ok növekedését (*http5*).

4.7 Növényekben előforduló *Escherichia coli* kimutatása

Az *E. coli* kimutatására Fluorocult táptalajt használtam melynek az az elve, hogy a célszervezetre jellemző enzim a fluorogén szubsztrátot cukor- vagy aminosavkomponensre és metilumbelliferonra hasítja. Az UV fény láthatóvá teszi a metilumbelliferont, és így a

fluorogén táptalaj értékelésére használják. Az anyag tipikus kék fluoreszcenciája pozitív eredményt jelez (<http6>).

4.8 Vizsgálat menete

4.8.1 A salátalevelek tisztítása

A két különböző kezelésből és a kontrollból is 3-3 db mintát vettem minden mintavételkor. A vizsgálati célból eltávolított növényeket először 1 liter 5%-os hypos oldatban lemostam, eltávolítva ezzel a szennyeződések a levelekről, és a talaj fragmentumokat a gyökerekről. A letisztított salátákat ezután behelyeztem 250 ml-es előre feliratozott főzőpoharakba, majd ráöntöttem 100 ml steril fiziológiás sóoldatot. Így rázattam a folyadékban salátákat 5 percig, 140-es fordulatszámom. A sóoldatot leöntöttem róla. Majd készítettem egy 1%-os hypos oldatot, ebből is 100 ml-t öntöttem a salátákra, és ezt is rázattam 5 percig, 140-es fordulaton. Majd a hypos oldatot is leöntöttem, és steril desztillált vízzel (100 ml/főzőedény) rázattam szintén 5 percig, 140-es fordulaton. A rázatás végeztével a desztillált vizet is leöntöttem a salátákról.



5. ábra: Vizsgálatra kivett saláta



6. ábra: Vizsgálni kívánt növények elhatárolása



7. ábra: Gyökerek megtisztítása a talaj aggregátumoktól



8. ábra: Megtisztított saláták lombikban

4.8.2 Salátaminták feldolgozása:



9. ábra: Salátalevél felosztása (<http7>)

A vizsgálat 5. hetétől kezdve a saláták már megfelelő méretűek voltak ahhoz, hogy több részletre tudjam bontani a kísérleti mintákat. Lamináris boksiban a képen látható módon vágtam szét a megtisztított leveleket, amelyeket a későbbiekben hajtás és levél jelzővel láttam el, a gyökeret fő- és mellégyökérre bontottam, amelyekből 1-1 grammos mintákat készítettem a baktériumok számának megállapításához.

Ezeket az 1 grammokat, 1g steril kvarchomokkal összedörzsöltem. Közben a dörzsmozsarat és az eszközöket etanollal fertőtlenítettem.



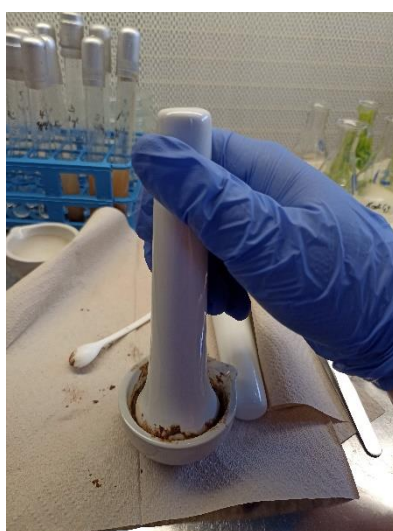
10. ábra: Bemért 1g salátalevél minta



11. ábra: Bemért 1g kvarchomok



12. ábra: Bemért salátalevél és kvarchomok

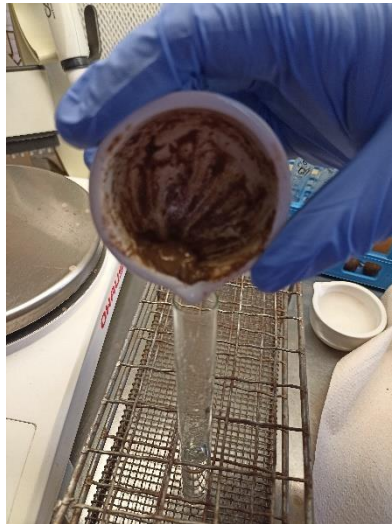


13. ábra: A minta dörzsmozsárral való vegyítése

Az 1g salátarésszel összedörzsölt 1 g homokot raktam a 9 ml-s hígítókba.



14. ábra: Az összevegyített minta és homok



15. ábra: Minta behelyezése a kémcsőbe



16. ábra: Minta és a hígítófolyadék összekeverése

Amikor elkészült az összes minta, a kémcsöveket 1 percig vortexeltem. A minták homogenizálása után Petri-csészékben lemezöntést végeztem.

A kontrollhoz a mintákat egyaránt vizsgáltam Fluorocult és HAL 002-es táptalajon.

A beoltott táptalajokat, fejjel lefelé, 37°C-os termosztátban egy napig inkubáltam.

A lemezöntést követően a kinőtt telepeket megszámláltam, majd a mintavételi hetek függvényében táblázatokban ábrázoltam.

A mintavétel 5. hetétől a saláta leveleket és a gyökérzetet is 2-2 részre bontottam, mert a saláták méretei megfelelőek voltak a levelek és a gyökerek biztonságos szeparálásához.

A 7. héttől kezelésként már 6-6 mintát vettem.

A táptalajon kifejlődött baktériumok kontaminációjának mértékét, illetve elhelyezkedésüket vizuálisan is szerettem volna szemléltetni, amelyet az eredmények fejezetben képeken mutatok be.

4.8.3 Lemosó folyadék kitenyésztése

A munka során felvetődött a kérdés, hogy bizonyosan csak a növényi szövetekbe bekerült baktériumokat sikerült-e kitenyészteni, vagy a levél felületét kolonizáló baktériumokat is. Ebből a célból lemezöntést végeztem a tisztítási folyamat utolsó lépéseként maradósó lemosófolyadékból, a salátamintákhoz hasonló módon.

4.9 Mikroszkópos vizsgálat

A növényi szövetekben megtelepedő baktériumok vizuális megfigyeléséhez a növényi szövetekből mikroszkopikus metszeteket készítettem. A vizsgált növényi részeket lamináris boksza alatt, alkohollal fertőtlenített pengével apróra vágtam, körülbelül 1 mm vastag metszeteket készítettem a levelekből, illetve a gyökér különböző részeiből. Az apróra vágott metszeteket a tárgylemezre helyeztem, majd 1 csepp steril desztillált vizet cseppentettem rájuk. Papírvattával felitattam a felesleges vizet, majd akridin narancs festéket cseppenttem a metszetekre. A festéket 2 percig hagytam állni a metszeten, majd a felesleges mennyiséget szintén felitattam papírvattával. Végül újból desztillált vizet cseppenttem rá, majd ráhelyeztem egy fedőlemezt, melyre pedig immerziós olaj került. Így helyeztem be a Fluoreszcens mikroszkóp alá, mellyel 100-as objektívvel néztem meg a preparátumokat.



17. ábra: Preparátum előkészítéséhez szükséges eszközök

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1 Növényi részekből kitenyészthető mikroorganizmusok eredményeinek bemutatása

1. táblázat: A kifejlődött *Escherichia coli* telepek száma

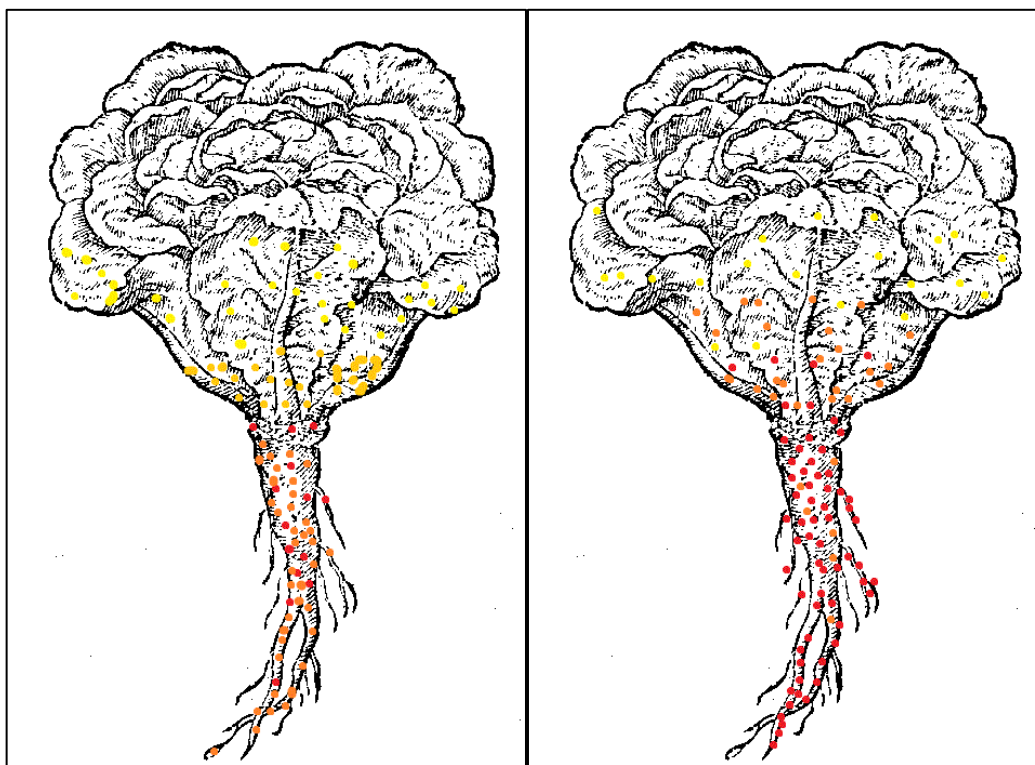
	<i>Escherichia coli</i>				
		Főgyökér	Mellégyökér	Hajtás	Levél
1.hét	A	$6,4 \times 10^1$		$2,9 \times 10^1$	
	B	$2,3 \times 10^1$		$2,9 \times 10^1$	
	C	5×10^0		$2,7 \times 10^1$	
2.hét	A	$9,4 \times 10^1$		$4,1 \times 10^1$	
	B	$1,26 \times 10^2$		$3,2 \times 10^2$	
	C	$2,94 \times 10^2$		$4,5 \times 10^1$	
3.hét	A	<10		<10	
	B	<10		3×10^0	
	C	8×10^0		1×10^0	
4.hét	A	$8,5 \times 10^1$		$7,2 \times 10^1$	
	B	>300		>300	
	C	>300		>300	
5.hét	A	>300	$2,59 \times 10^2$	$1,1 \times 10^1$	$1,14 \times 10^2$
	B	$4,9 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	10×10^0	8×10^0
	C	$1,39 \times 10^2$	$6,7 \times 10^1$	$1,9 \times 10^1$	$9,7 \times 10^1$
6.hét	A	$8,3 \times 10^1$	3×10^1	4×10^0	$2,4 \times 10^1$
	B	2×10^1	$1,8 \times 10^1$	2×10^0	$1,1 \times 10^1$
	C	$7,6 \times 10^1$	$8,2 \times 10^1$	1×10^0	$1,7 \times 10^1$
7.hét	A	3×10^3	$2,9 \times 10^3$	<10	5×10^2
	B	7×10^2	3×10^2	<10	$1,8 \times 10^3$
	C	$2,8 \times 10^3$	1×10^3	<10	5×10^1
	D	$5,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	<10	<10
	E	1×10^2	$2,3 \times 10^3$	<10	2×10^2
	F	$1,4 \times 10^3$	1×10^3	<10	$1,8 \times 10^3$
8.hét	A	$1,2 \times 10^2$	1×10^1	1×10^1	<10
	B	2×10^1	1×10^1	<10	<10
	C	7×10^1	1×10^2	<10	<10

	D	3×10^1	8×10^2	<10	6×10^1
	E	$3,7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	<10	<10
	F	$3,6 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	<10	4×10^2

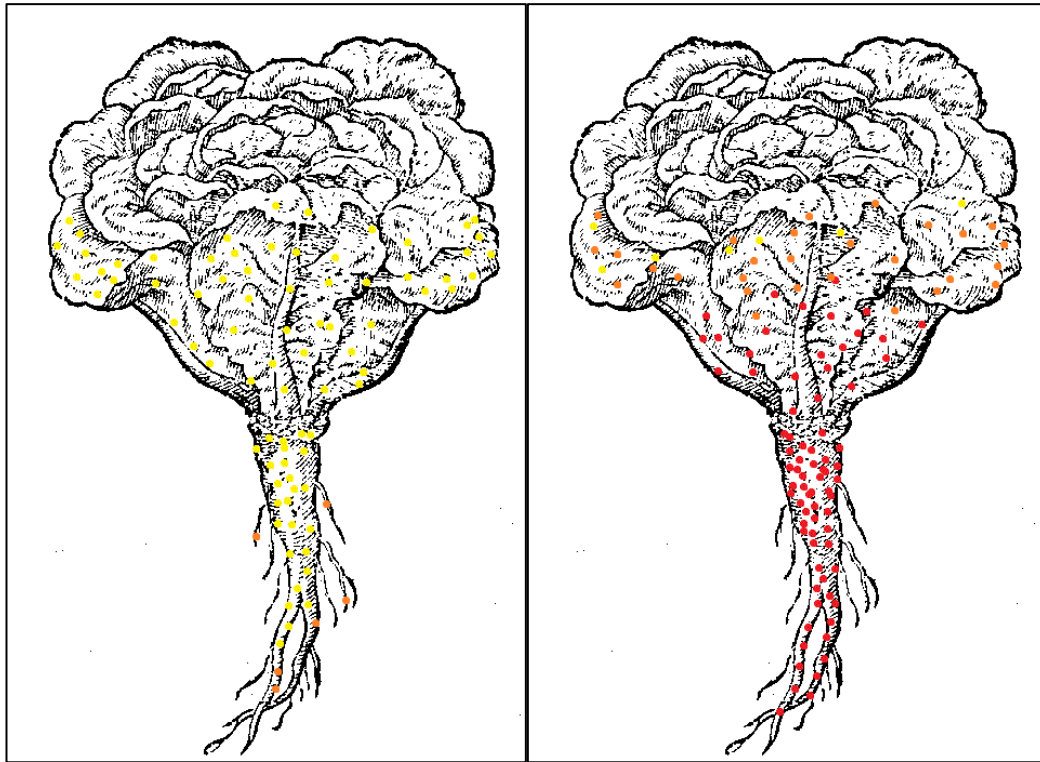
2. táblázat: A kifejlődött *Listeria innocua* telepek száma

		<i>Listeria innocua</i>			
		Főgyökér	Mellégyökér	Hajtás	Levél
1.hét	A	$1,37 \times 10^2$		$1,17 \times 10^2$	
	B	>300		$8,6 \times 10^1$	
	C	>300		$7,3 \times 10^1$	
2.hét	A	$2,64 \times 10^2$		$3,9 \times 10^1$	
	B	$5,32 \times 10^2$		$1,5 \times 10^1$	
	C	$8,92 \times 10^2$		$1,2 \times 10^2$	
3.hét	A	$1,7 \times 10^1$		6×10^0	
	B	$7,6 \times 10^1$		$1,5 \times 10^1$	
	C	$2,1 \times 10^1$		5×10^0	
4.hét	A	$1,63 \times 10^2$		$7,1 \times 10^1$	
	B	$6,4 \times 10^1$		$3,9 \times 10^1$	
	C	6×10^2		$2,4 \times 10^1$	
5.hét	A	$4,2 \times 10^1$	$8,7 \times 10^1$	$2,8 \times 10^1$	$5,1 \times 10^1$
	B	$8,4 \times 10^1$	$9,6 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$
	C	$8,9 \times 10^1$	$1,07 \times 10^2$	$4,4 \times 10^1$	$6,7 \times 10^1$
6.hét	A	$2,9 \times 10^1$	$4,2 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$	$2,7 \times 10^1$
	B	$3,7 \times 10^1$	$4,4 \times 10^1$	8×10^0	$2,3 \times 10^1$
	C	$1,8 \times 10^1$	$3,4 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$
7.hét	A	$7,2 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	6×10^2	$1,2 \times 10^3$
	B	$7,7 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$	7×10^2	1×10^3
	C	$6,1 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$	<10	8×10^2
	D	$5,7 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	1×10^2	$1,1 \times 10^3$
	E	5×10^4	$5,9 \times 10^4$	4×10^2	6×10^2
	F	$7,4 \times 10^4$	8×10^4	3×10^2	1×10^3
8.hét	A	$4,2 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	3×10^1	3×10^1

B	1×10^4	$4,2 \times 10^3$	8×10^1	1×10^1
C	$3,9 \times 10^3$	5×10^3	4×10^1	1×10^1
D	$7,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	4×10^1	2×10^1
E	$5,3 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	2×10^1	$1,2 \times 10^2$
F	$4,6 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	5×10^1	$1,8 \times 10^2$

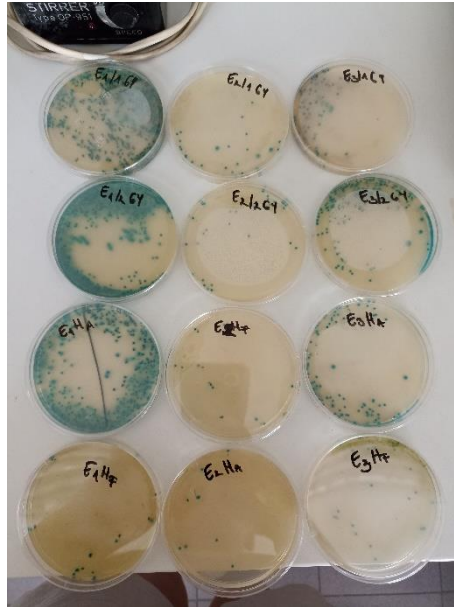


18. ábra: *Escherichia coli* átlagos fertőzöttségi szintje a kezelt saláta növényekben, a vizsgálati időszak 5. (a) és 7. (b) hetében. Citromsárgával jelölve a $>10^1$, sötét citromsárgával a 10^1 - 10^2 , narancssárgával 10^2 - 10^3 -on, pirossal jelölve a $>10^3$ -en szintű fertőzöttségi szintek.

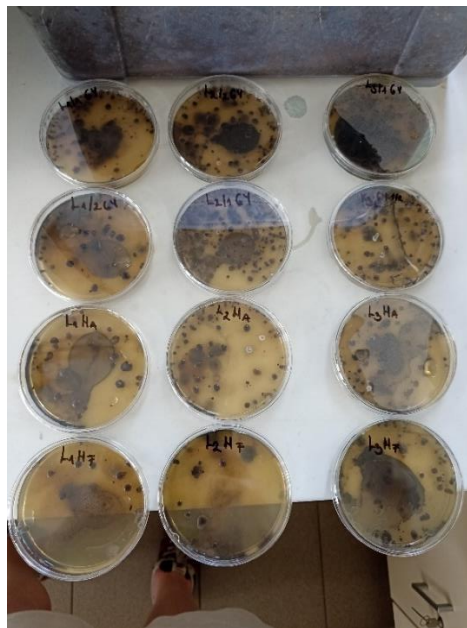


19. ábra: *Listeria innocua* átlagos fertőzöttségi szintje a kezelt saláta növényekben, a vizsgálati időszak 5. (a) és 7. (b) hetében. Citromsárgával jelölve a $>10^1$, sötét citromsárgával a 10^1-10^2 , narancssárgával 10^2-10^3 -on, pirossal jelölve a $>10^3$ -en szintű fertőzöttségi szintek.

A képeken jól látszik, hogy a hetek elteltével a kontamináció mértéke nőtt a gyökérben, illetve a levelekben is.

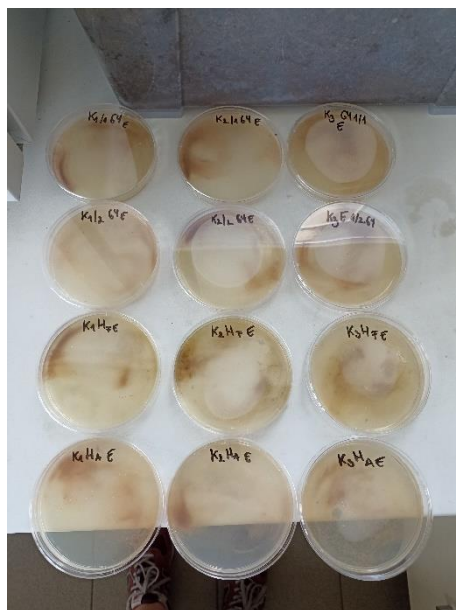


20. ábra: *Escherichia coli* telepek szelektív táptalajon



21. ábra: *Listeria innocua* telepek szelektív táptalajon

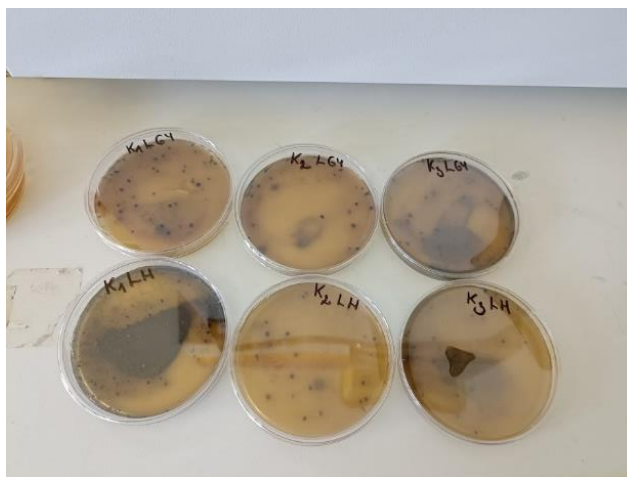
A főgyökér rész jobban fertőződött, illetve a levél azon része amely közelebb helyezkedik el a gyökér részhez.



22.ábra:Kontoll minták kitenyésztése

A kontroll minták kitenyésztésekor a Petri-csészében látható barna foltok a kvarchomokkal összedörzsölt salátarészekből adódóan láthatók. Baktériumok nem fejlődtek ki rajta.

A kontroll minták HAL002-es *Listeria* szelektív tápagon való lemezöntésekor, a *Listeria innocua*hoz hasonló, fekete, fényes telepek is megjelentek a tápagon, de ezek nem *Listeria innocua* telepek voltak, ezért számukat, a *Listeria*val szennyezett mintákból kivontam.



23.ábra: Kontroll minta HAL002-es táptalajon

5.2 Tisztítófolyadékából kitenyészthető mikroorganizmusok eredményei

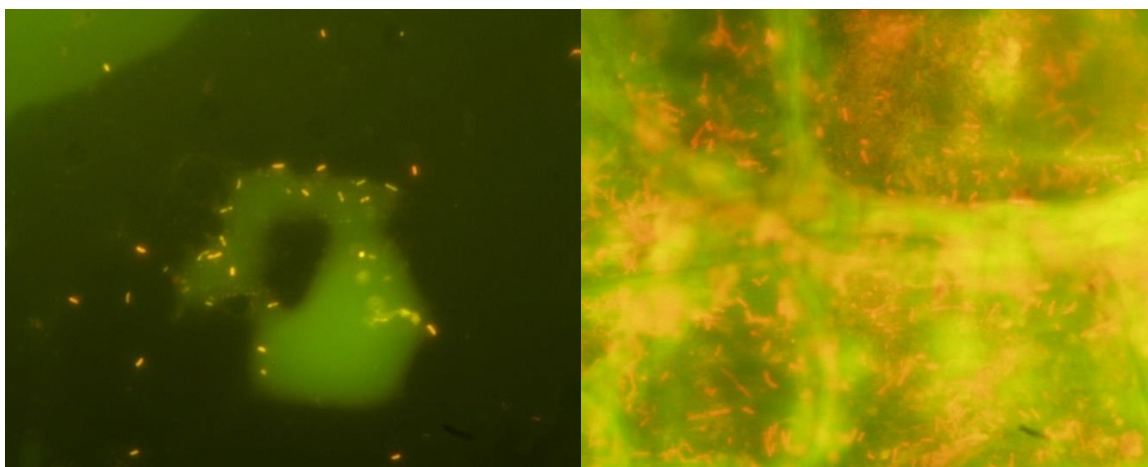
A tisztítási mechanizmus utolsó lépéseként vett mosófolyadék minták eredménye, negatív lett, amiből arra a következtetésre jutottam, hogy sikeresen csak a belső növényi szövetekből sikerült a baktériumokat kitenyészteni.



24. ábra: Mosófolyadékra kapott eredmény

5.3 Fluoreszcens mikroszkóp vizsgálati eredmények

A preparátumok mikroszkópos vizsgálata során fényképet készítettem a növényi részeibe bekerült kórokozókról. A képen láthatóak az akridin narancssal festett baktérium sejtek elhelyezkedése, mind a gyökér-, mind a levélrészekből vett mintákban. A levélmintából nem sikerült megfelelő vékonyra vágni a mintát, ezért több sejtsor vastag rétegben látszódnak a sejtek.



25. ábra: A gyökérbe (a) és a levélbe (b) bejutott baktériumok

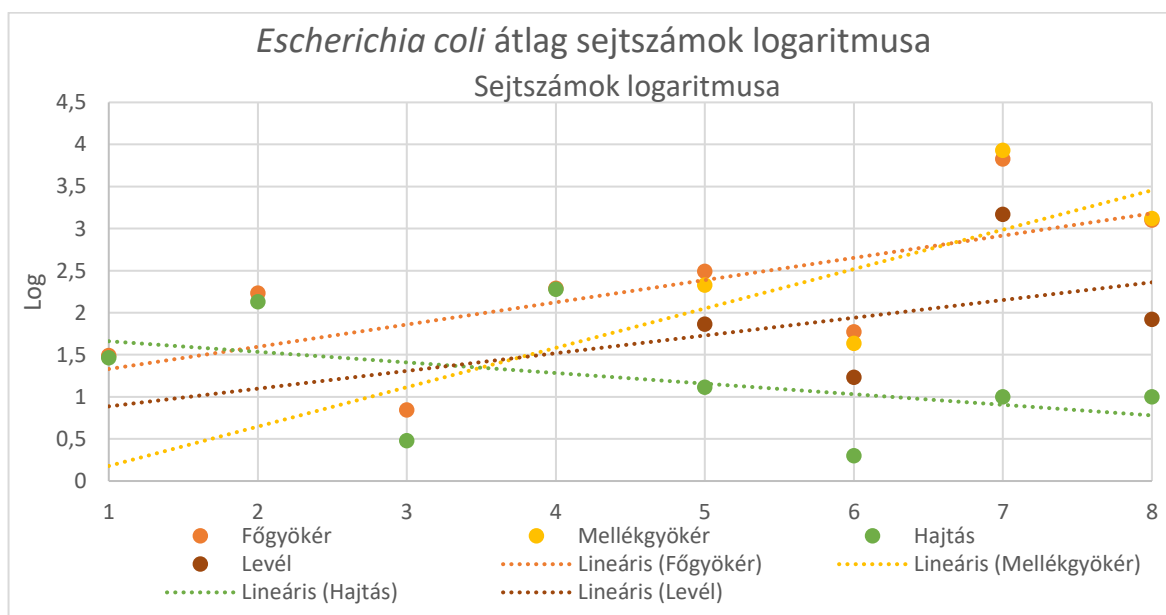
5.4 *Escherichia coli* sejtszámának alakulása hajtásban és gyökérben a vizsgálati időszakban

3. táblázat: *Escherichia coli* átlag sejtszám

	1.hét	2.hét	3.hét	4.hét	5.hét	6.hét	7.hét	8.hét
Főgyökér	31	171	7	195	310	59	6717	1256
Mellégyökér					212	43	8533	1320
Hajtás	29	135	3	190	13	2	10	10
Levél					73	17	1476	83

4.táblázat: *Escherichia coli* átlag sejtszámok logaritmusai

	1.hét	2.hét	3.hét	4.hét	5.hét	6.hét	7.hét	8.hét
Főgyökér	1,49	2,23	0,85	2,29	2,49	1,77	3,83	3,1
Mellégyökér					2,33	1,63	3,93	3,12
Hajtás	1,46	2,13	0,48	2,28	1,11	0,3	1	1
Levél					1,86	1,23	3,17	1,92



26.ábra: *Escherichia coli* átlag sejtszám alakulása logaritmikusan

A táblázatban és a diagrammon ábrázoltam az *Escherichia coli* baktérium átlag sejtszámának alakulását, illetve a sejtszámok logaritmus értékeit a kísérleti hetek függvényében. Lineáris trendvonalakat illesztettem a salátarészek sejtszámainak logaritmusára.

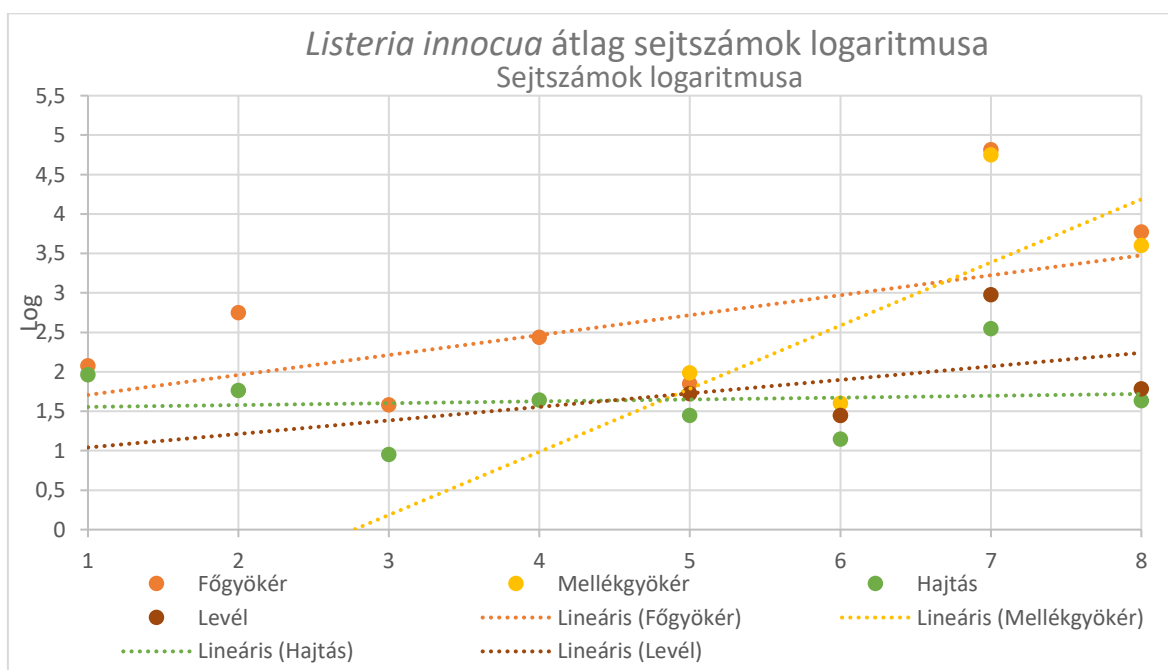
5.5 *Listeria innocua* sejtszámának alakulása hajtásban és gyökérben a vizsgálati időszakban

5. táblázat: *Listeria innocua* átlag sejtszám

	1.hét	2.hét	3.hét	4.hét	5.hét	6.hét	7.hét	8.hét
Főgyökér	119	562	38	275	71	28	65166	5950
Mellékgyökér					97	40	56333	4016
Hajtás	92	58	9	44	28	14	351	43
Levél					53	28	950	61

6. táblázat: *Listeria innocua* átlag sejtszámok logaritmusai

	1.hét	2.hét	3.hét	4.hét	5.hét	6.hét	7.hét	8.hét
Főgyökér	2,07	2,74	1,57	2,43	1,85	1,44	4,81	3,77
Mellékgyökér					1,98	1,60	4,75	3,60
Hajtás	1,96	1,76	0,95	1,64	1,44	1,14	2,54	1,63
Levél					1,72	1,44	2,97	1,78



27. ábra: *Listeria innocua* átlag sejtszám alakulása

A táblázatban és a diagrammon ábrázoltam a *Listeria innocua* baktérium átlag sejtszámának alakulását, illetve a sejtszámok logaritmus értékeit a kísérleti hetek függvényében. Végül trendvonalat illesztettem a sejtszámok logaritmusára.

5.6 MALDI-TOF MS vizsgálat eredményei

A növényi részekből kitenyésztett mikrobák MALDI-TOF azonosításakor arra az eredményre jutottam, hogy az identifikáció során a telepek nagy megbízhatósággal, hibán belüli azonosítási eredményt mutattak az oltóanyagként használt törzseimmel.

A MALDI-TOF MS által történő mikroba azonosítás értelmezése: Az eredmény magas konzisztenciát mutat, ha magas az egyezés a könyvtár referencia törzsével. Ebben az esetben faj szintű azonosítás lehetséges. Alacsony konzisztenciájú eredménynél, ha a könyvtár referencia törzsével, alacsony egyezést mutat, akkor csak nemzetségi szinten tudunk adatot kapni. Az eredmény nem mutat konzisztenciát, akkor nem tudjuk beazonosítani a baktériumot, további vizsgálatok szükségesek. (Bruker MALDI Biotyper Identification Results)

7.táblázat: Pontértékek jelentése (Bruker MALDI Biotyper Identification Results)

Meaning of Score Values			
Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

A MALDI-TOF MS vizsgálat pontosságát nagyban befolyásolja a preparáció elkészítése és a mérés között eltelt idő. A hosszabb idő elteltével nem biztos, hogy ugyanazt a törzset fogja kimutatni, amelyekkel a növények szennyezése történt, ezért arra a megállapításra jutottam, hogy ha az első három helyen kimutatja az általam bejuttatott baktériumot, akkor elfogadom az eredményt.

8.táblázat: Az első mintavételkor kapott *E. coli* eredmények

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
A8 (+) (B)	5EH1 (Standard)	Escherichia coli	1.81	Escherichia coli	1.80
A9 (+++)(A)	5EH2 (Standard)	Escherichia coli	2.08	Escherichia coli	2.07
A10 (+++)(A)	5EH2 (Standard)	Escherichia coli	2.24	Escherichia coli	2.11
A11 (+) (B)	5G1 (Standard)	Escherichia coli	1.90	Escherichia coli	1.79

9.táblázat: A második mintavételkor kapott *E. coli* és *Listeria innocua* eredmények


Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
A1 (+++)(A)	A1 (Standard)	Escherichia coli	2.32	Escherichia coli	2.18
C1 (+++)(A)	C1 (Standard)	Listeria innocua	2.08	Listeria innocua	2.08
C2 (+++)(A)	C2 (Standard)	Escherichia coli	2.49	Escherichia coli	2.40

A táblázatból jól látszik, hogy a mérések során a mintákat faj, illetve nemzetség szinten is nagy megbízhatósággal mutatta ki a MALDI-TOF MS.

Sample 6											
Sample Name:	A6										
Sample Description:											
Sample ID:	4EG1										
Sample Creation Date/Time:	2022-04-26T12:41:44.220										
Sample Type:	Standard										
Identification Method:	MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1										
Preprocessing Method:	MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1										
ACQ Method:	D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par										
ACQ Timestamp:	2022-04-26T12:51:59.525										
AutoXecute Method:	MBT_AutoX										
Applied Taxonomy Tree:	Taxonomy, Bruker Taxonomy, Projects, Saját izolatumok										
Escherichia coli	10 hits	2.06	2.05	1.99	1.96	1.94	1.93	1.93	1.91	1.88	1.77

28. ábra: Az első mintavétel A6-os mintájára (gyökér részből vett *Escherichia coli*) kapott eredmények

Az első mintavételi héten, az A6-os mintáról vett találatok szemrevételezésekor megállapítható, hogy mind a 10 találat az *Escherichia coli* fajt mutatta ki.

Sample 6			
Sample Name:	A6	<small>HUNGARIAN UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES</small>	
Sample Description:			
Sample ID:	4EG1		
Sample Creation Date/Time:	2022-04-26T12:41:44.220		
Sample Type:	Standard		
Identification Method:	MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1		
Preprocessing Method:	MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1		
ACQ Method:	D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par		
AutoXecute Method:	MBT_AutoX		
Consistency Category (based on 2 best matches):	A		
Applied Taxonomy Tree:	Taxonomy, Bruker Taxonomy, Projects, Saját izolatumok		

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Escherichia coli DH5alpha BRL	2.06	562
2 (+++)	Escherichia coli DSM 1576 DSM	2.05	562
3 (+)	Escherichia coli MB11464_1 CHB	1.99	562
4 (+)	Escherichia coli ATCC 25922 THL	1.96	562
5 (+)	Escherichia coli DSM 682 DSM	1.94	562

29.ábra: A6-os gyökérrészből vett mintára kapott *E. coli* eredmények

Az első hét, A6-os mintára kapott találatok pontértéküket jobban megvizsgálva, az első kettő találat (+++) nagy megbízhatóságú azonosításnak, a többi (+) alacsony megbízhatóságú azonosításnak tekinthető.

Az NCBI azonosító honlapján az 562 azonosítóval ellátott *Escherichia coli*, az általam bejuttatott, ATCC 11775 számú volt ([http9](http://9)).

Ezáltal arra a következtetésre jutottam, mivel az általam bejuttatott *E. coli* törzs az első három találatban megtalálható, illetve zöld színt is kapott az azonosítás mértékében, így elfogadhatónak minősítettem a mérést.

Sample 2

Sample Name: C1
Sample Description:
Sample ID: C1
Sample Creation Date/Time: 2022-05-03T11:41:20.178
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
ACQ Timestamp: 2022-05-03T11:43:40.693
AutoXecute Method: MBT_AutoX
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy, Bruker Taxonomy, Projects, Saját izolatumok

Listeria innocua	8 hits	2.08	2.08			2.04	2.03	2.03	2.03	2.02	2.01
Listeria monocytogenes	2 hits			2.06	2.06						

30. ábra: A második mintavétel levél részről vett *Listeria innocua*, C1-es mintára kapott eredmények

A második mintavételi héten, a levélből vett *Listeria innocua* C1-es mintáról vett találatok szemrevételezésekor megállapítható, hogy a 10 találatból 8 találat nagy megbízhatósággal a *Listeria innocua*, illetve 2 találat a *Listeria monocytogenes* törzseket mutatta ki.

Sample 2



Sample Name: C1
Sample Description:
Sample ID: C1
Sample Creation Date/Time: 2022-05-03T11:41:20.178
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoXecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): A
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy, Bruker Taxonomy, Projects, Saját izolatumok

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Listeria innocua CCUG 18949 CCUG	2.08	1642
2 (+++)	Listeria innocua CCUG 22270 CCUG	2.08	1642
3 (+++)	Listeria monocytogenes CCUG 32843 CCUG	2.06	1639
4 (+++)	Listeria monocytogenes CCUG 61052 CCUG	2.06	1639
5 (+++)	Listeria innocua CCUG 27612 CCUG	2.04	1642

31. ábra: C1-es levél mintára kapott *Listeria* eredmények

A C1-es levélminta első három pontértékeit jobban megvizsgálva, az első két helyen 2,08-as pontértékkal a *Listeria innocua*, a harmadik helyen pedig a *Listeria monocytogenes* áll 2,06-os pontértékkal.

Az NCBI azonosító honlapján az 1642-es azonosítóval ellátott *Listeria innocua*, az általam bejuttatott, ATCC 33090 számú volt ([http10](http://10)).

Ezáltal arra a következtetésre jutottam hasonlóan, mint az *Escherichia coli*-nál, itt is az első három találatban megtalálható volt az általam bejuttatott baktérium, illetve zöld színt is kapott az azonosítás mértékében, így itt is elfogadhatónak minősítettem a mérést.

D9 (+++)(A)	D9 (Standard)	Bacillus licheniformis	2.13	Bacillus licheniformis	1.93
D10 (+)(B)	D10 (Standard)	Bacillus licheniformis	1.99	Bacillus licheniformis	1.77

32. ábra: A kontroll minta HAL002-es tápagon kinőtt telepek beazonosítása

6.Összefoglalás

Dolgozatomban az *Escherichia coli* és *Listeria monocytogenes* terjedésének vizsgálatát végeztem salátanövény kísérletben. A *Listeria monocytogenes* modellezésére *Listeria innocua* baktériumot használtam. A két kezelésen kívül, még volt egy kontroll mintacsoport is, amelyet steril desztillált vízzel öntöztem. Az első három hétben, mind a három kezelés talaját 60%-os relatív nedvességtartalomra állítottam be, steril desztilláltvízzel. A vizsgálat során, a vetést követő negyedik héten kezdtem el fertőzött öntözővízzel öntözni a saláták termesztő közegét. A kontroll saláták talajának öntözését pedig folytattam a steril desztilláltvízzel. Az ezt követő nyolc hétben hetente egyszer, kezelésenként három darab növényt távolítottam el a termesztő ládákból, a baktérium kontamináció meghatározás céljából. A növényekből alapos tisztítást követően, lamináris boxban, levél, illetve a gyökér részekből 1-1 gramm mintákat vettem, amelyeket 1 gramm steril kvarchomokkal dörzsmozsárban összedörzsöltem, majd törzsoldatot készítettem belőlük. A vortex segítségével homogenizált mintákból steril Petri-csészékben lemezöntést végeztem. Az *Escherichia coli*val szennyezett növényekhez Fluorocult-, a *Listeria innocua*val szennyezettekhez pedig Harlequin- tápagarokat használtam. A kontroll növényeket mind a két tápagaron kitenyésztettem.

Mikroszkópos vizsgálatokat is végeztem, hogy meggyőződjek arról, hogy helyes az állítás, miszerint a növényi részekben jelen vannak a vizsgált baktériumok. Ehhez vékony metszeteket készítettem mind a gyökér részből, mind a levelek egyes részeiből. Ezt követően annak érdekében, hogy az *Escherichia coli* és *Listeria innocua* sejtek láthatóak legyenek a mikroszkopikus képen, akridin narancs festékkel megfestettem a metszeteket. A mikroszkópos vizsgálat során láthatóvá váltak a baktérium sejtek a saláta részeiben.

Céлом volt, hogy megerősítsem az általam kijutatott baktériumokat sikerült kitenyésztennem a vizsgálat során, illetve azokat a baktérium sejteket láttam a mikroszkópos vizsgálatban, ezért MALDI-TOF MS-el újra azonosítottam a táptalajon kinőtt telepeket. Az *Escherichia coli* esetében faj szinten sikerült, nagy megbízhatósággal azonosítani az oltóanyagként használt baktériumot. A minták részletesebb vizsgálatánál az illesztett mintaképnél többféle törzset is kimutatott a rendszer. Arra a következtetésre jutottam, ha az általam bejutatott törzs az első három hely egyikén szerepel, akkor az oltóanyaggal azonosnak minősítem a vizsgált telepet. A *Listeria* nemzetségnél 80%-os többséggel az *innocua* fajt igazolta a rendszer. A kontroll salátákból vett minták kitenyésztésekor a

HAL002-es táptalajon a *Listeria*hoz hasonló, fekete telepek is kifejlődtek, amelyek MALDI-TOF MS-el mérve, *Bacillus licheniformis* baktériumot kaptam eredményül. Emiatt a *Listeria* sejtszám eredményekből mindig kivontam a kontrollon kinőtt fekete telepek számát.

Következtetésként levonható, hogy szükséges volt a kétféle visszaellenőrzés, mert így pontosabb képet kaptam a baktériumok számának alakulásáról.

Az eredményeim és a 4. számú melléklet a 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet alapján ezek a saláta minták kifogásolhatóak, mert a kapott eredmények a maximálisan megengedett mikroba számot meghaladják.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban a családomnak a mester képzés alatt való önzetlen segítségükért és támogatásukért!

Szeretném még megköszönni az Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia, - és biztonság Tanszék, valamint az Agrárkörnyezettani Tanszék összes munkatársának a segítőkész hozzáállását, és a kísérletem elvégzéséhez nyújtott segítséget.

8.Irodalmi hivatkozás:

1. Ackers, M. L., B. E. Mahon, E. Leahy, B. Goode, T. Damrow, P. S. Hayes, W. F. Bibb, D. H. Rice, T. J. Barrett, L. Hutwagner, P. M. Griffin, and L. Slutsker. 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis.* 177:1588–1593.
2. Adams, M.R., Hartley, A.D. & Cox, L.J. (1989). Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiology*, 6, 69–77
3. Adhikari N. D., Simko I., Mou B. (2019): Phenomic and Physiological Analysis of Salinity Effects on Lettuce. Crop Improvement and Protection Research Unit, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Salinas
4. Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Kent, M. P., Koochmarai, M. (2004). *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *Journal of food protection*, 67(4), 658-665.
5. Balázs S. (szerk.) (1994): *Zöldségtermesztők kézikönyve*, ISBN 963 8439 37 8, Mezőgazda Kiadó, Budapest
6. Beuchat, L.R. (1998). Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Unit, World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2, 42 pp.
7. Beuchat, L. R. (1999): Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. *J. Food Prot.* 62:845–849.
8. Beuchat, L.R. & Brackett, R.E. (1990). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *Journal of Food Science*, 55, 755–758.
9. Beuchat, L. R., B. V. Nail, B. B. Adler, and M. R. S. Clavero. 1998. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *J. Food Prot.* 61:1305–1311.
10. Bíró Gy., Kubányi J., Shenker-Horváth K. (szerk.) (2016): *Táplálkozási Akadémia Hírlevél* 9. évf., 6. szám-2016. június, Változatos Salátafélék
11. Boodram A., Hutchinson, L., Sam C., Walcott E., Yusuf A., Suepaul S., Persad A.K. (2022): *Escherichia coli* contamination of lettuce (*Lactuca sativa*) sold in

- Trinidad and Tobago, Tropical Agriculture (Trinidad) Vol.99 No.1, pp.38-46.,
Trinidad, West Indies
12. Brackett, R.E. (1987). Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*.
Journal of Food Protection, 50, 999–1003
 13. Brandl M. T., Amundson R. (2008): Leaf Age as a Risk Factor in Contamination of
Lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. Produce Safety
and Microbiology Research Unit, Agricultural Research Service, U.S. Department
of Agriculture, Albany, California Applied and Environmental Microbiology, p.
2298–2306
 14. Centers for Disease Control and Prevention. 1999. Outbreak of *Escherichia coli*
O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington county fair—
New York, 1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48:803–804.
 15. Chalmers, R. M., H. Aird, and F. J. Bolton. 2000. Waterborne *Escherichia coli*
O157. *J. Appl. Microbiol.* 88:124S–132S.
 16. Islam M., Doyle M. P., Phatak S.C., Millner P., Jiang X. (2004): Persistence of
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Soil and on Leaf Lettuce and
Parsley Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation
Water. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 7, 2004, Pages 1365–1370,
 17. Kim M. J., Moon Y., Tou J. C, Mou B., Waterland N. L. (2016): Nutritional value,
bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.), *Journal of*
Food Composition and Analysis 49 (2016) 19–34
 18. Křístková E., Doležalová I., Lebeda A., Vinter V., Novotná A. (2008): Description
of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources
Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc,
Olomouc-Holice, Czech Republic Hort. Sci. (Prague), 35, 2008 (3): 113–129
 19. Kyere E. O., Palmer J., Wargent J. J., Fletcher G. C., Flint S. (2018): Colonisation
of lettuce by *Listeria Monocytogenes*. *International Journal of Food Science and*
Technology 2018, pp 1-11.
 20. NicAogáin K., O’Byrne C.P. (2016): The Role of Stress and Stress Adaptations in
Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food
Chain, *Frontiers in Microbiology, Sec. Food Microbiology*
Volume 7 - 2016
 21. Nicollea C., Cardinaultb N., Gueuxb E., Jaffrelob L., Rockb E., Mazurb A.,
Amouroux P., Rémésy C. (2004): Health effect of vegetable-based diet: lettuce

- consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat, *Clinical Nutrition* (2004) 23, 605–614, Chappes, France
22. Panyor Á., Hipszki F.D. (2022): A magas rosttartalmú zöldségek és gyümölcsök szerepe a táplálkozásban, *Jelenkori társadalmi és gazdasági folyamatok*, (2022) XVII. évfolyam, 3–4. szám, pp. 23–34.
 23. Pál T. (szerk.) (2013): *Az orvosi mikrobiológia tankönyve 2. átdogozott kiadás*, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, ISBN 978 963 226 463 9
 24. Pink D. A. C., Keane E. M. (1993): Lettuce *Lactuca sativa* L Genetic Improvement of Vegetable Crops, pp.543-571, ISBN 978-0-08-040826-2
 25. Pfau C., Müller A., Bács Z., Bácsné Bába É. (2018): Az egészséges táplálkozás szerepe és jelentősége, *Táplálkozásmarketing*, V. évfolyam, 2018/1. szám
 26. Poimenidou, S.V., Chatzithoma, D.N., Nychas, G.J. & Skandamis, P.N. (2016). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat, salinity and low pH, after habituation on cherry tomatoes and lettuce leaves. *PLoS ONE*, 11, e0165746
 27. Quilliam R. S., Williams A. P, Jones D.L. (2012): Lettuce Cultivar Mediates Both Phyllosphere and Rhizosphere Activity of *Escherichia coli* O157:H7. School of Environment, Natural Resources and Geography, College of Natural Sciences, Bangor University, Bangor, Gwynedd, United Kingdom, *PLoS ONE*
 28. Solomon E.B., Yaron S., Matthews K. R. (2002): Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization. Department of Food Science, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey 08901 *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 397–400
 29. Takácsné dr. Hájos M. (2020): *Szántóföldi zöldségtermesztés*, Debreceni Egyetem, Második, átdogozott kiadás) ISBN 978-963-318-887-3
 30. Wieser A., Schneider L., Jung J. and Schubert S. (2012): MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review) *Appl Microbiol Biotechnol* (2012) 93:965–974, München
 31. Xu C., Mou B. (2015): Evaluation of Lettuce Genotypes for Salinity Tolerance *HORTSCIENCE* 50(10):1441–1446., U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 1636 East Alisal Street, Salinas, CA 93905
 32. Zhang, S. & Faber, J.M. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*, 13, 311–321.

33. http1: https://biokiskert.hu/bio/humil/#tab-additional_information 2022.06.27.
34. http2: <https://florimo.hu/termekeink/viragfold/florimo-palanta-es-magveto-fold/> 2022.06.27
35. http3: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria_innocua 2023.04.23.
36. http4: <https://www.atcc.org/products/33090> 2023.04.22.
37. http5: <https://docplayer.hu/1277117-Hal001-harlequin-salmonella-abc-hal002-harlequin-listeria-medium-hal003-harlequin-tbga-tbx.html> 2022.07.19.
38. http6: <https://www.merckmillipore.com/HU/hu/products/industrial-microbiology/bioburden-testing/microbiological-water-testing/water-testing-for-food-and-beverage-industry/rapid-cultural-testing-methods/fluorogenic-media/T3qb.qB.TR0AAAFDLXFUTxI.,nav?RedirectedFrom=%2Freadycult&RefererURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F> 2023.04.23.
39. http7: <https://www.canstockphoto.hu/sal%C3%A1tlev%C3%A9l-3316406.html>
40. http8: https://s4.lite.msu.edu/res/msu/botonl/b_online/schaugarten/LactucasativaL/BLactucasativaL1b.gif 2023.02.21.
41. http9: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=562> 2023.04.20
42. http10: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=1642> 2023.04.20.
43. *IR-30 Automatikus nedvesség meghatározó készülék- Használati utasítás*
44. Bruker MALDI Biotyper Identification Results

NYILATKOZAT

a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: PIÉTER EVA
A Hallgató Neptun kódja: CCRNW2
A dolgozat címe: ESCHERICHIA COH ÉS LISTERIA INNOCUA DETEKTÁLÁSANYERŐS NÖVÉNYI ALAPANYAGOKBÓL MALDI-TOF MS SEGÍTSÉGÉVEL
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: ÉLELMISZER- MIKROBIOLÓGIA, HIGIÉNIA, ÉS BIZTONSÁG TANSZÉK

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió² egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023 év 05 hó 03 nap

Pieter
Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

A PLÉZER, ÉVA (név) (hallgató Neptun azonosítója: CCRNW2)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfólió¹ áttekintettem, a hallgatót az
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól
tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védelemre
javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem³

Kelt: 2023 év 05 hó 03 nap



Belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: MSc Élelmiszerbiztonsági és –minőségi mérnök

Diplomadolgozat készítés helye: Magyar Agrár- és Élettudomány Egyetem, Élelmiszer-
mikrobiológia, -higiénia, és –biztonság Tanszék

Hallgató: Plézer Éva

A diplomadolgozat címe: *Escherichia coli* és *Listeria innocua* detektálása nyers növényi
alapanyagokból MALDI-TOF MS segítségével

Konzulens: Dr. Kocsis Tamás

Beadás dátuma: 2023.05.03.



diplomadolgozat készítés helyének vezetője
(Mohácsiné dr. Farkas Csilla)



konzulens
(Dr. Kocsis Tamás)



Mohácsiné dr. Farkas Csilla
szakfelelős