

# A hűtve tárolt ponty (*Cyprinus carpio*) romlásában szerepet játszó baktériumok azonosításának módszertani tapasztalatai

Kaszab E<sup>1</sup>, Radó J<sup>1</sup>, Farkas M<sup>1</sup>, Bokor Á<sup>1</sup>, Szerdahelyi G S<sup>1</sup>, Tóth G<sup>1</sup>, Harkai P,  
Nyírő-Fekete B<sup>2</sup>, Micsinai A<sup>2</sup>, Szoboszlay S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Szent István Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő

<sup>2</sup>Wessling Hungary Kft., Budapest



SZENT ISTVÁN  
EGYETEM

MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZET-  
TUDOMÁNYI KAR, GÖDÖLLŐ



AKVAKULTÚRA- ÉS  
KÖRNYEZETBIZTONSÁGI  
INTÉZET



**WESSLING**

Quality of Life



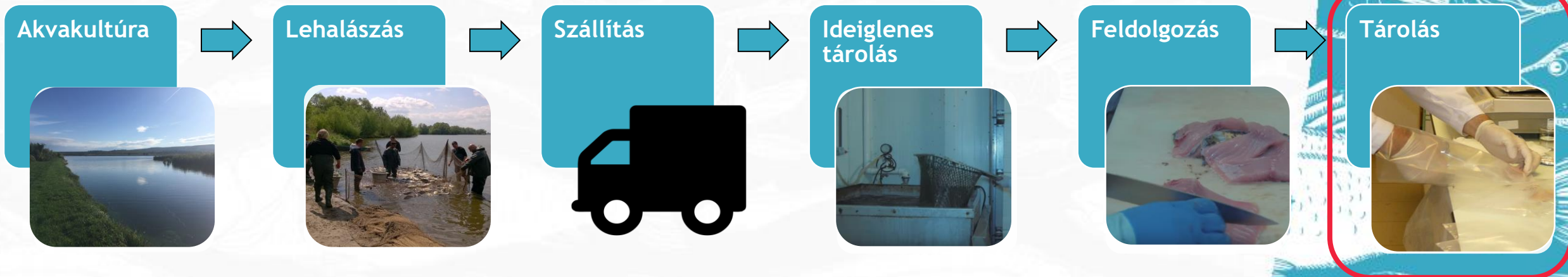
# Témafelvetés

- Az akvakultúra Magyarországon is növekvő jelentőségű agrár-ágazat
  - A ponty (*Cyprinus carpio*), a hazai halgazdaságok egyik kulcsfaja
  - Cél:
    - kiváló minőségű, biztonságos, jól tárolható haltermék előállítása
  - Feladatok:
    - A romlási folyamatokban szerepet játszó mikroorganizmusok megismerése
    - Tárolhatóság növelését célzó beavatkozások előkészítése
- ↓
- Gyors és hatékony identifikációs megoldások keresése



# Terület és módszer

- Jelenleg közel 300 ha-on üzemelő halastó
- Mintavétel és vizsgálat a halastó, a feldolgozás és a tárolás teljes folyamatában
  - vizsgálati időszak: 2018. május-július →
- Megismételt tárolási kísérlet
  - vizsgálati időszak: 2018. október-november

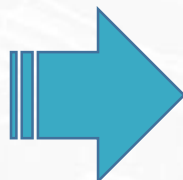


# Ponty tárolási kísérlet – mikroba identifikáció



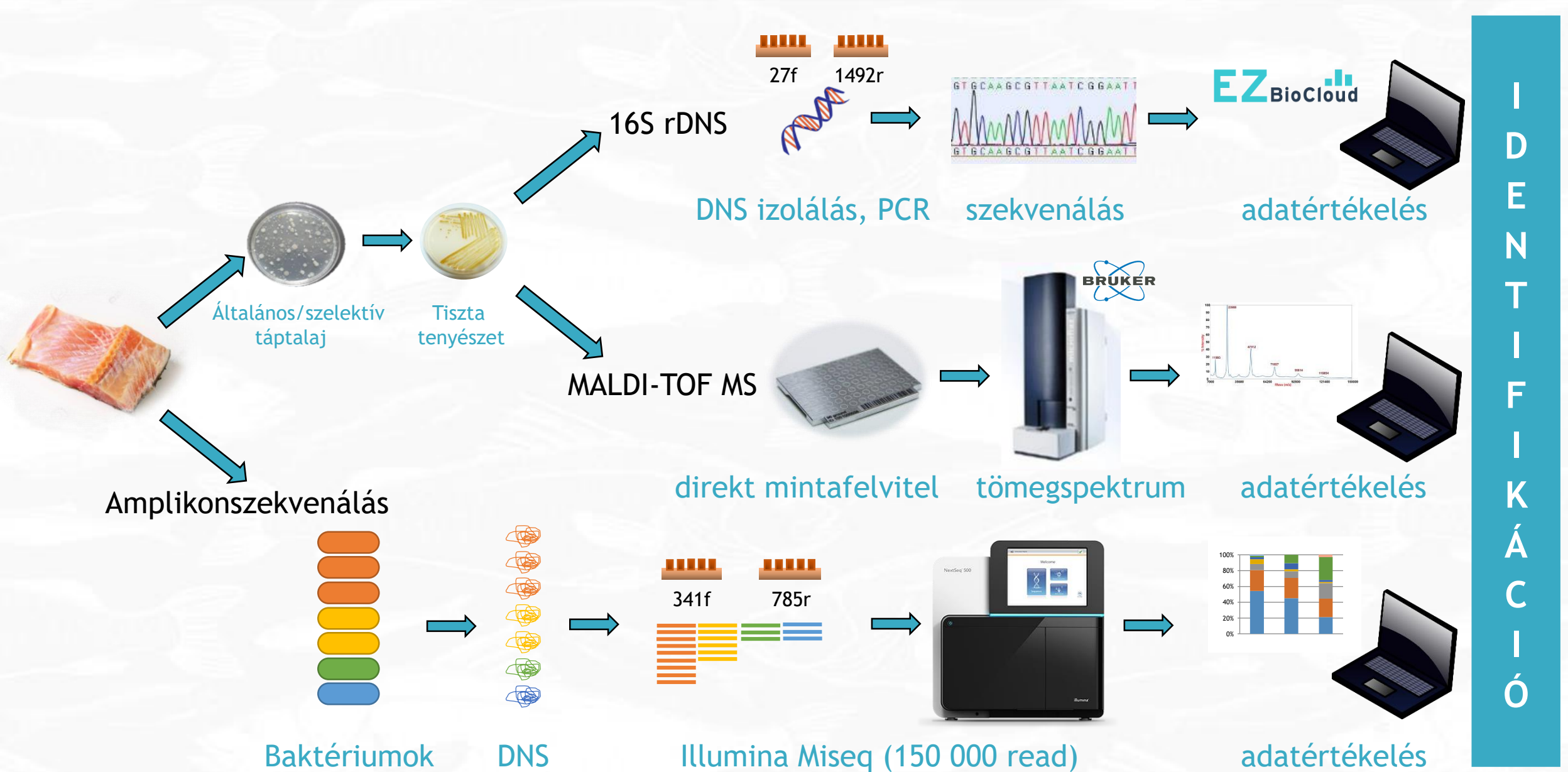
2-4 °C  
vákuum  
nincs vákuum

6-8 °C  
vákuum  
nincs vákuum



Módszerek	Előnyök	Hátrányok
Tenyésztéses módszerek + biokémiai tesztek	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Olcsó</li> <li>• Nem igényel speciális eszközöket</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Időigényes (24-72h)</li> <li>• Csak tenyésztető mikroszervezetek</li> <li>• Téves identifikáció esélye nagy</li> </ul>
Tenyésztés+ 16S rDNS szekvenálás	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Érzékeny</li> <li>• Pontos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Csak tenyésztető mikroszervezetek</li> <li>• Időigényes (tenyésztés + 48-72h)</li> </ul>
MALDI-TOF MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gyors</li> <li>• Megbízható</li> <li>• Bővíthető</li> <li>• Kevésbé drága, mint a molekuláris és immunológiai vizsgálatok</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nagy beruházási igény</li> <li>• A választott tenyésztési mikrobiológiai módszer behatárolja a lehetőségeket</li> <li>• A könyvtárban nem szereplő fajokat „nem látja”</li> </ul>
Amplikonszekvenálás	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A nem tenyésztető mikroszervezeteket is „látja”</li> <li>• Nagyfelbontású, pontos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drága</li> <li>• Képzett laboratóriumi személyzet és szoftveres háttér szükséges</li> <li>• Időigényes adatelemzés</li> <li>• Nincs a „kezünkben” az adott törzs</li> </ul>

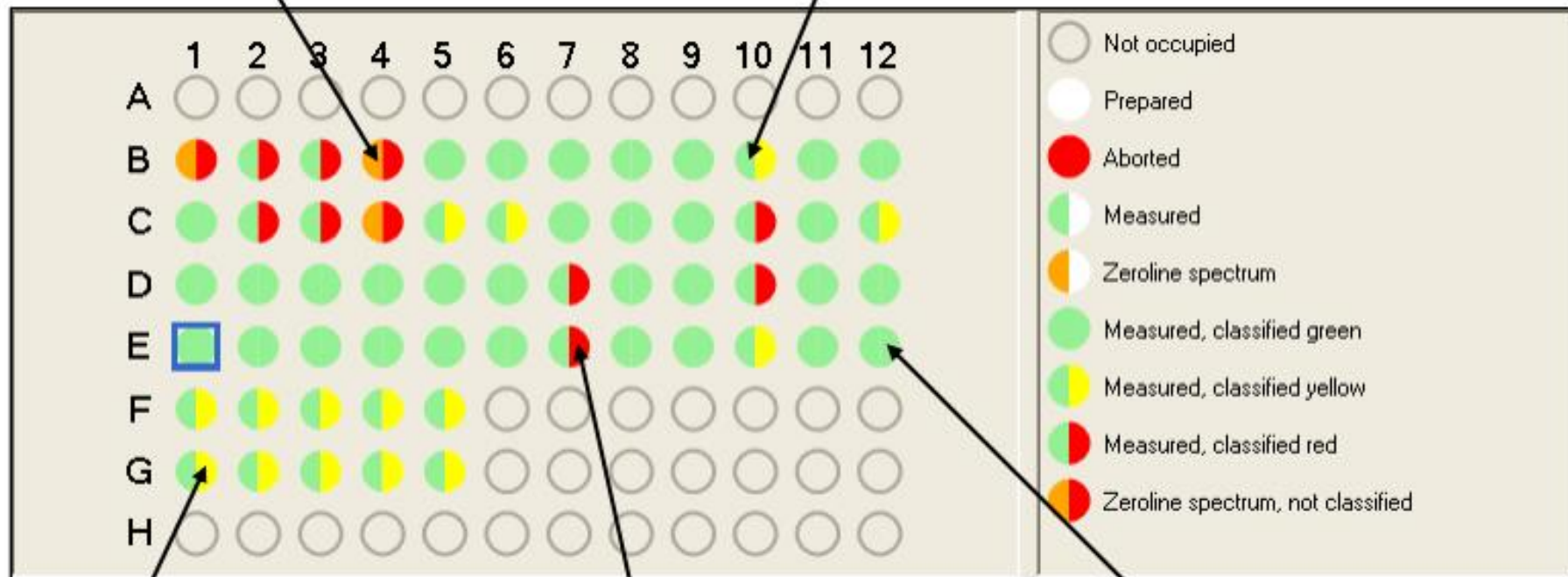
# A választott mikroba-identifikációs módszerek



I  
D  
E  
N  
T  
I  
F  
I  
K  
Á  
C  
I  
Ó

Nem megfelelő tömegspektrum

Megfelelő tömegspektrum



$2,00 > \text{„Score érték”} > 1,70$   
azonosított faj (genus)

„Score érték”  $< 1,70$   
az azonosítás megbízhatósága  
nem megfelelő

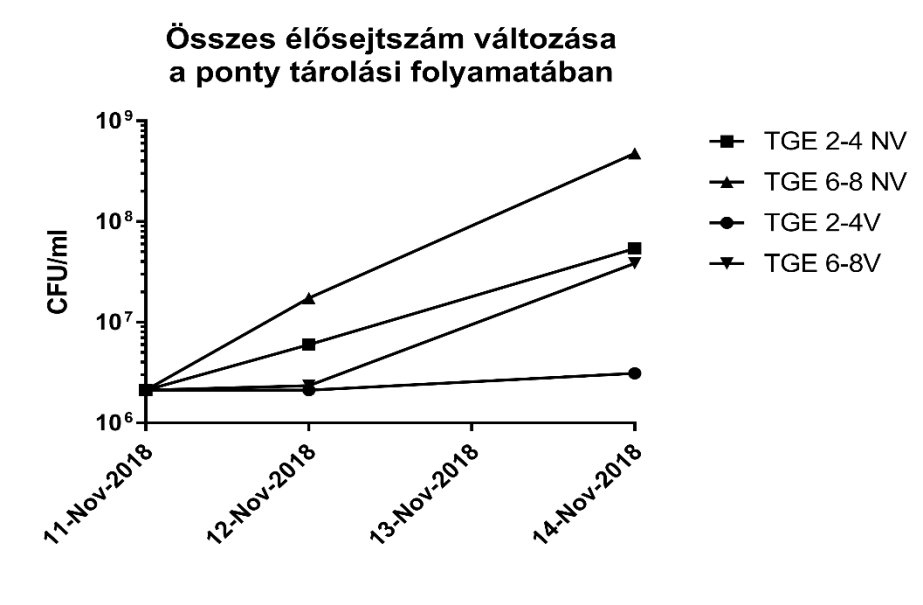
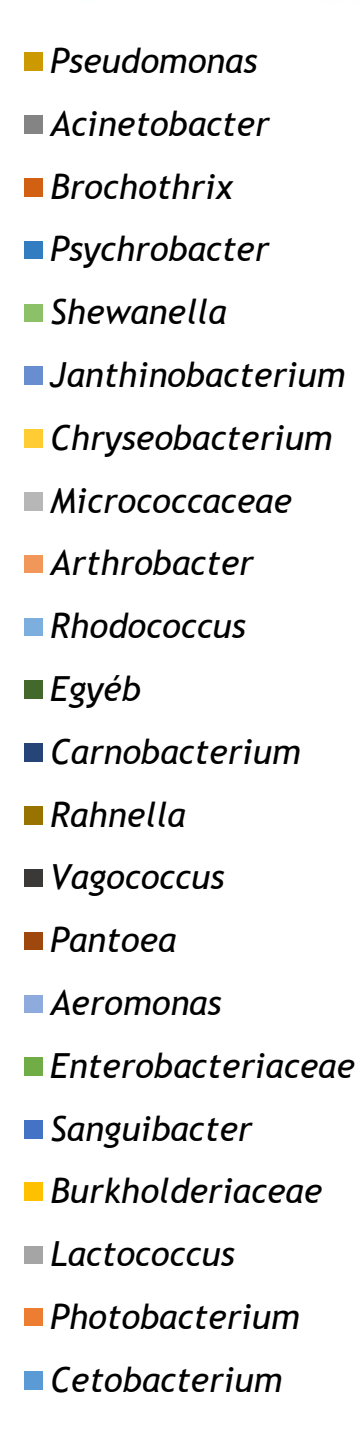
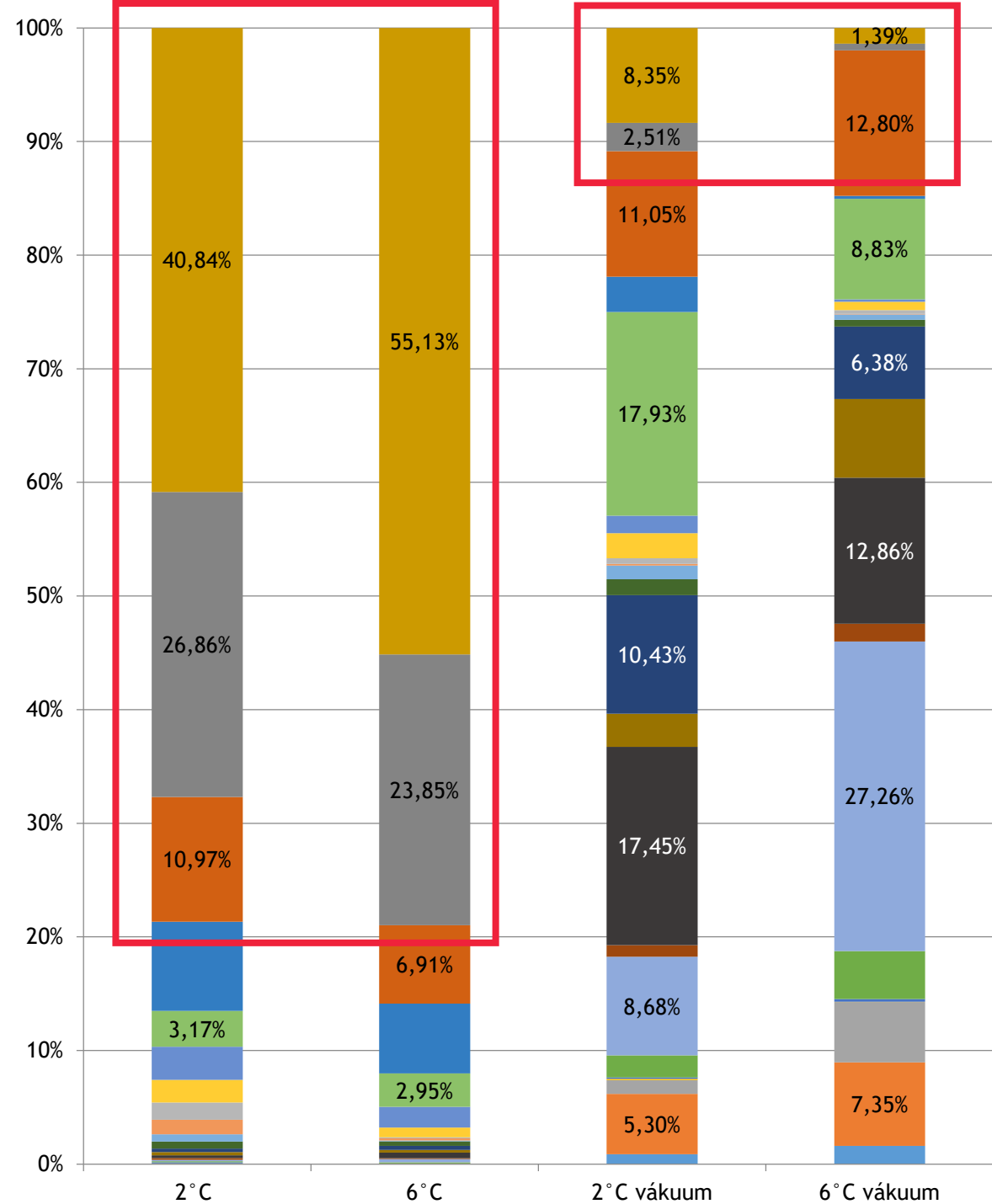
„Score érték”  $> 2,00$   
azonosított mikroorganizmus

# EREDMÉNYEK









- A vákuumcsomagolás egyértelműen befolyásolja az összes élősejtszámot, a domináns nemzetségek összetételét és részarányát a mikrobiális közösségben
- A tárolási hőmérséklet hatása kisebb. Kivétel: *Aeromonas* nemzetség (magasabb hőmérsékleten jobban tolerálja a vákuumcsomagolást)

# A vizsgált haltermék romlásában szerepet játszó főbb nemzetségek

Vákuumcsomagolás nélkül (hőmérséklettől függetlenül):

*Pseudomonas* > *Acinetobacter* > *Brochothrix* > *Psychrobacter* > *Shewanella*

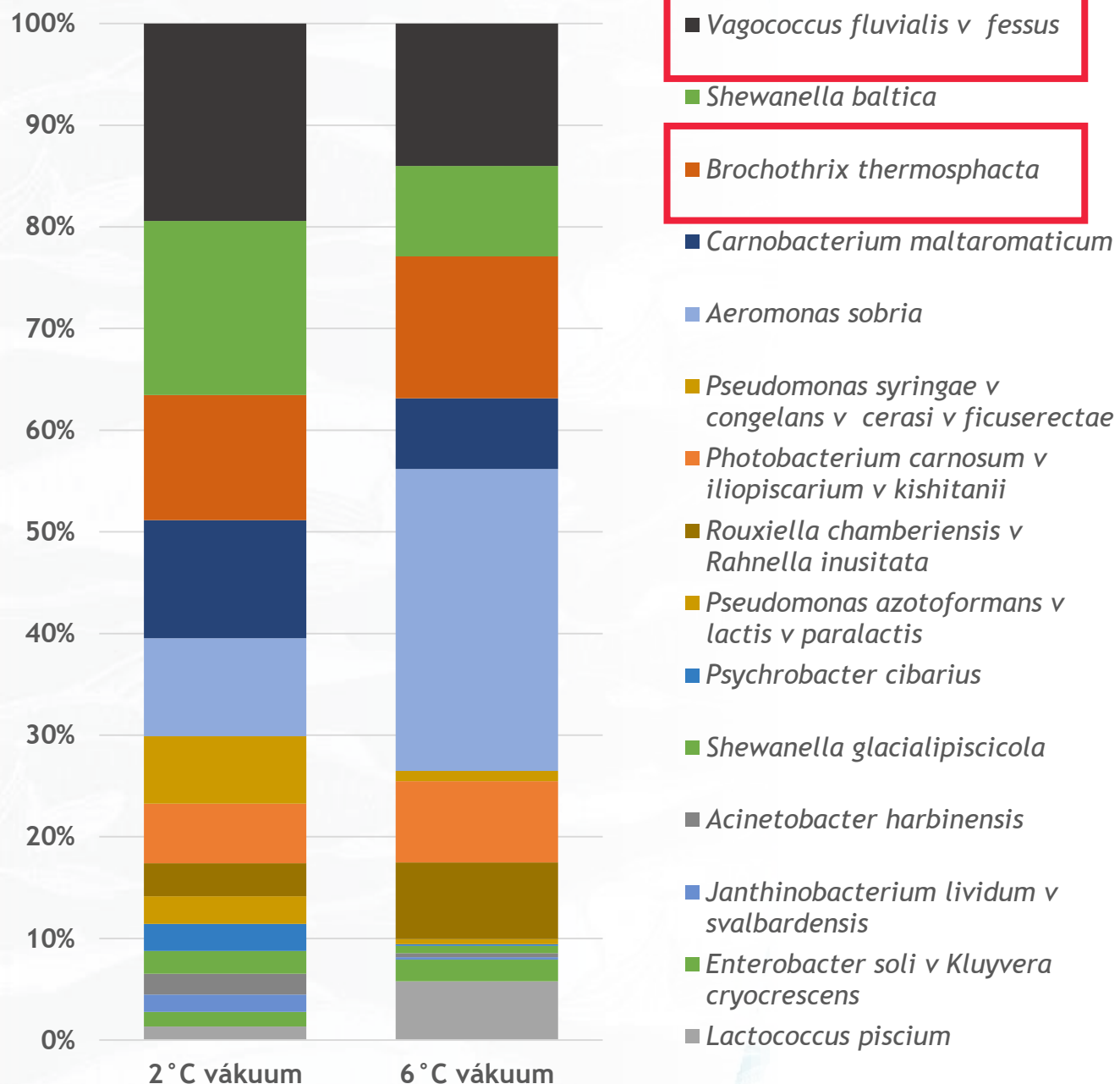
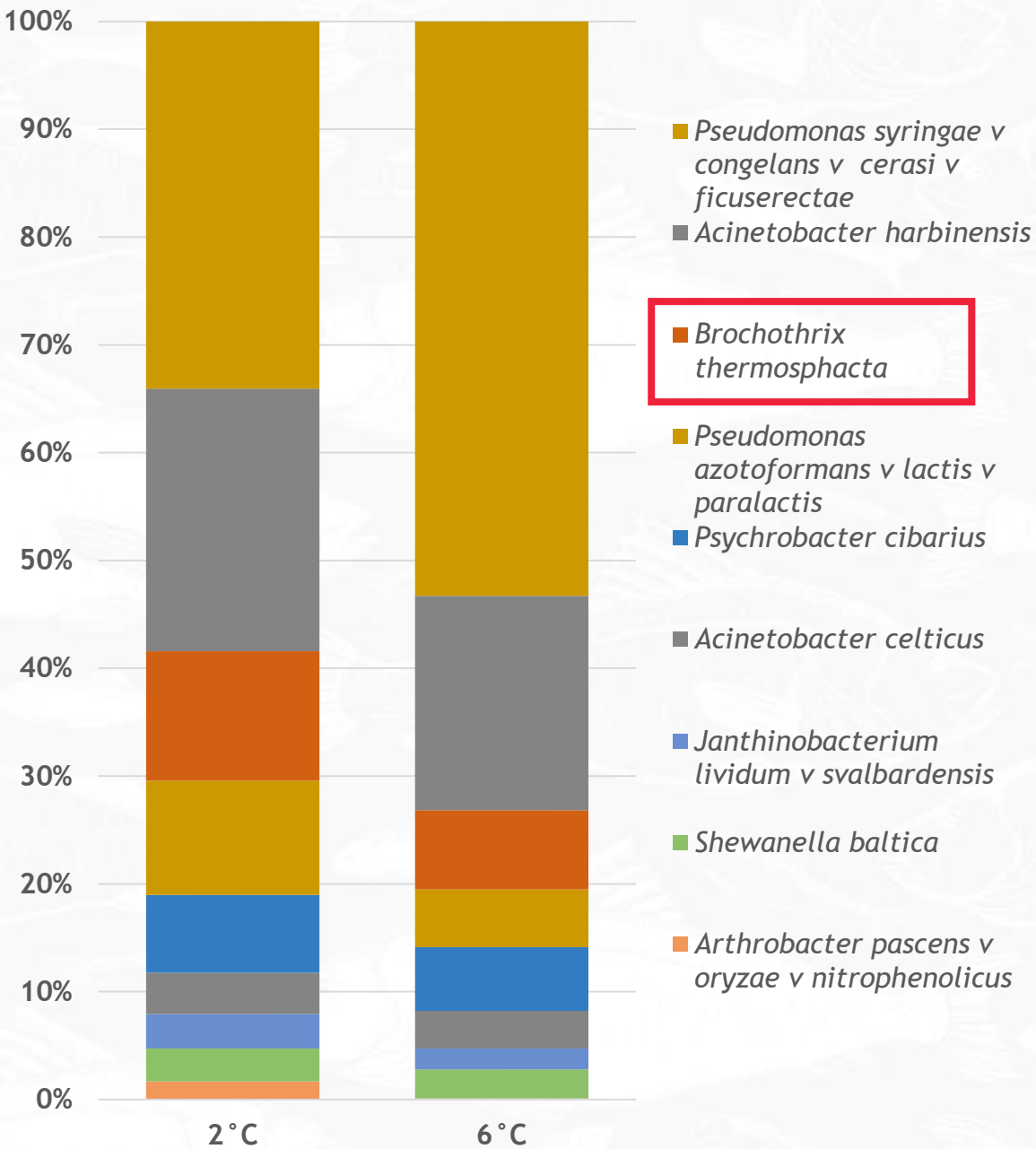
Vákuumcsomagolással 2°C-on

*Shewanella* > *Vagococcus* > *Brochothrix* > *Carnobacterium* > *Aeromonas* > *Pseudomonas* > *Photobacterium*

Vákuumcsomagolással 6°C-on

*Aeromonas* > *Vagococcus* > *Brochothrix* > *Shewanella* > *Photobacterium* > *Rahnella* > *Carnobacterium* > *Lactococcus*

# Domináns fajok (amplifikonszekvenálás)



# A haltermék romlásában feltehetően szerepet játszó, eddig nem azonosított fajok

## *Brochothrix thermosphacta*

- gram+, fakultatív anaerob, pszichotróf, élelmiszerek romlásában közreműködő baktérium
- alkalmazkodik a vákuumcsomagolás körülményeihez (Kilcher et al., 2010)
- nemkívánatos, illékony komponenseket termel, mint az acetoin, diacetil, tejsav és etanol
- **ponty esetében még nem írták le a romlást okozó ágensként** (laphal)

## *Vagococcus fluvialis*

- gram+, motilis coccus, tejsavbaktérium, először baromfitrágyából és folyók vizéből izolálták (Hashimoto et al., 1974, 1979)
- probiotikus hatását igazolták aranydurbincs és farkassügér esetében (Román et al., 2012)
- acetoin termelésre képes
- **haltermék romlásában játszott szerepét még nem írták le**

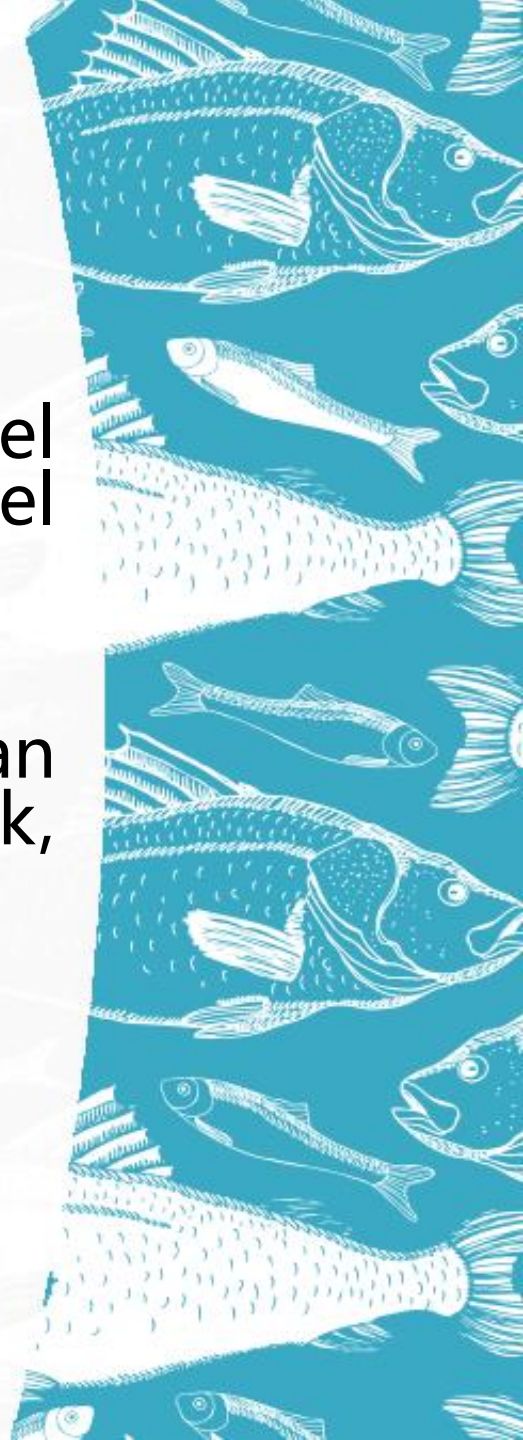


# MALDI-TOF MS és 16S rDNS identifikáció összevetése

- A MALDI-TOF MS identifikáció direkt mintafelvitellel 65,8%-ban volt sikeres, 1,70 feletti score értékkel (hibalehetőség: direkt felvitel?)
- A 16S rDNS szekvenáláson alapuló identifikáció 85,4%-ban volt sikeres (hibalehetőség: kevert szekvencia, nincs termék, rövid szekvencia)

A 16S alapú identifikációhoz képest a MALDI-TOF MS megfelelő score érték ( $>2,00$ ) esetén

- **65,8%-ban faj szinten egyező**
- **31,6%-ban genus szinten egyező**
- **2,6%-ban ellentmondásos eredményt ad.**



# Mennyit „lát” az amplikonszekvenálással azonosított fajokból a tenyésztéses mikrobiológia?

A tenyésztéses mikrobiológiából kiinduló identifikációs módszerek

- számos, kisebb jelentőségű nemzetség és faj azonosításához vezettek (*Chryseobacterium*, *Rhodococcus*, *Pantoea*)
- egyes domináns nemzetségek egybehangzóan nem kerültek segítségükkel kimutatásra (*Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Photobacterium*, *Psychrobacter*)

**Feltételezett ok:**

- A kiindulási tenyésztéses vizsgálatok nem fedték le a domináns mikroorganizmusok fiziológiai igényeit (táptalajválasztás, inkubációs hőmérséklet)

Vákuumcsomagolás nélkül

Amplikonszekvenálás	16S rDNS	MALDI-TOF
<i>Pseudomonas syringae</i> filogenetikai csoport (11 faj)	✗	✗
<i>Acinetobacter harbinensis</i>	✗	✗
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	✓	✓
<i>Pseudomonas azotoformans/lactis/paralactis</i>	✓	✓
<i>Psychrobacter cibarius</i>	✗	✗

Vákuumcsomagolással

Amplikonszekvenálás	16S rDNS	MALDI-TOF
<i>Vagococcus fluvialis/fessus</i>	✗	✗
<i>Shewanella baltica</i>	✓	✓
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	✓	✓
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	✗	✗
<i>Aeromonas sobria</i>	✓	✓
<i>Pseudomonas syringae</i> filogenetikai csoport (11 faj)	✗	✗
<i>Photobacterium carnosum/ilio piscarium/kishitanii</i>	✗	✗

# Amiért mégis érdemes tenyésztéses mikrobiológiát (is) választani...

- Jelenleg 248 törzset számláló, unikális törzsgyűjtemény került kialakításra a projekt keretében
- Három, a *Chryseobacterium* nemzetségbe tartozó, pontytermékről izolált törzs új faj kandidáns (<98% alatti 16S rDNS homológia)
- Az izolátumok felhasználásával
  - beazonosíthatók pontytermék romlásában, organoleptikus paramétereinek megváltozásában szerepet játszó vegyületek
  - célzott kezelések, beavatkozások tesztelésére nyílik lehetőség
  - meghatározhatók egyes élelmiszerbiztonsági és környezetegészségügyi szempontból fontos tulajdonságok (pl. antibiotikum rezisztencia)



# További feladatok I.

- Célzott tenyésztéses eljárásokkal izolálni az amplikonszekvenálás alapján domináns, de még nem kitenyésztett mikroorganizmusokat (*Vagococcus*, *Photobacterium* fajok)
- Feltárni a már azonosított fajok szerepét a pontytermék romlási folyamatában
- Kezelési lehetőségek vizsgálata célzott laboratóriumi tesztekkel
- A ponty teljes termékpályájának végig követése a mikrobiológiai állapot javítását célzó beavatkozási pontok feltárása érdekében





# További feladatok II.

- A MALDI-TOF MS módszer környezet- és élelmiszer-mikrobiológia felhasználhatóságának elősegítése
  - Más mintafelviteli módszerek alkalmazásával, tesztelésével
  - A MALDI-TOF könyvtár bővítése új, környezet- és élelmiszer-mikrobiológiai szempontból jelentős fajokkal (pl. *Pseudomonas psychrophila*)



# Köszönöm a figyelmet!



A kutatómunka az „Új kockázatkezelési modellrendszer fejlesztése a víz- és élelmiszerbiztonság növelése érdekében a haltermékvonalon” NVKP\_16-1-2016-0023 projekt keretében valósult meg.



„A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Emberei Erőforrások Minisztériuma által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (1783-3/2018/FEKUTSTRAT) támogatta, a Szent István Egyetem vízzel kapcsolatos kutatások tématerületi programja keretében.”



Köszönet a Wessling Hungary Kft. munkatársainak a MALDI-TOF MS vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

