



*A kép illusztráció / The picture is illustration*

Belák Ágnes<sup>1</sup>

Érkezett/Received: 2014. február/February – Elfogadva/Accepted: 2014. július/July

# A biológiai kontroll alkalmazási lehetőségei élelmiszer eredetű patogén baktériumok gátlására

## 1. Összefoglalás

A fogyasztók számára az élelmiszerbiztonság ma már nem egy ismeretlen, vagy nehezen meghatározható fogalom. Egészségük megőrzése érdekében egyre nagyobb figyelmet fordítanak a jó minőségű, vitaminokban és ásványi anyagokban gazdag táplálék elfogyasztására, mindemellett kiemelkedően fontos számukra, hogy az elfogyasztott élelmiszer ne okozzon egészségkárosodást. Az aktuális trendek mindig is hatással voltak a fogyasztók táplálkozási szokásaira, ennek következtében az elmúlt években egyre nagyobb lett az érdeklődés a minimális feldolgozással előállított, fogyasztásra kész élelmiszerek iránt. Ezek a termékek azonban sok esetben komoly megbetegedéseket okozó patogén mikroorganizmusokat tartalmaznak, amelyek elfogyasztása súlyosabb esetekben akár halálhoz is vezethet. A biológiai kontroll alkalmazása, mint alternatív technológia hozzájárulhat, hogy biztonságosabb, a kémiai tartósítószeret mellőző termékek kerülhessenek a fogyasztók asztalára.

## 2. Bevezetés

A patogén mikroorganizmusokkal szennyeződött élelmiszerek elfogyasztása súlyos megbetegedések kialakulásához, illetve bizonyos esetekben akár halálhoz is vezethet. Az egészségügyi kockázatokon túl azonban jelentős gazdasági károkat is okozhat egy-egy élelmiszerrel terjedő patogén mikroorganizmus. A fogyasztók egészségének védelme, valamint az ökonómiai veszteségek csökkentése érdekében tehát fontos feladat a kórokozó baktériumok szaporodásának és az azt befolyásoló tényezőknek a mélyreható vizsgálata. A szaporodásra kifejett ökológiai faktorokon belül a mikroba populációk összetétele, mérete, és a populáció tagjainak kölcsönhatása is jelentős tényező a patogén baktériumok szaporodása, túlélése és megbetegítő képessége szempontjából.

Az élelmiszerekben a kórokozó baktériumok általában kis számban találhatók meg, de már kis sejtkoncentráció mellett is súlyos tünetekkel járó megbetegedéseket okozhatnak. Mind az állati, mind a növényi élelmiszer alapanyagokból gyakran mutathatók ki olyan patogén baktériumok, amelyek enterális (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*) vagy akár súlyosabb, az idegrendszerre is kiható (*Listeria monocytogenes*) megbetegedéseket okoznak. Mivel a zöldségeket és gyümölcsöket sok esetben nyersen fogyasztjuk, a mikrobiológiai kockázat ezen élelmiszerek

esetén igen magas. A patogén baktériumok a felületen megtapadva, vagy akár a növény szövetébe behatolva túlélhetik a fogyasztás előtti minimális mikrobaszám-csökkentő eljárásokat, így az emberi szervezetbe juthatnak, és ott elszaporodva súlyos tüneteket válthatnak ki. A mikroorganizmusok növényi szövetekbe történő behatolása és perzisztenciája azonban még kevésbé ismert folyamat. Az endofita mikroorganizmusok felfedezése óta (1904) számos kutatás folyt annak megállapítása érdekében, hogy a mikroorganizmusok hogyan képesek a szövetekbe bejutni, és ott milyen kapcsolatot alakítanak ki a gazdaszervezettel. A növényi szövetekből többek között kimutatták már *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* és *Cronobacter sakazakii* jelenlétét [16], azaz kórokozó baktériumok is internalizálhatják a növényi szöveteket és ott endofitaként túlélhetnek [3], [1].

A humánpatogén baktériumok elleni védekezés fontos feladat tehát élelmiszerbiztonsági és humán-egészségügyi szempontból is. A patogének visszaszorítására és az élelmiszerek tartósítására számos hagyományos és modern technológiai eljárás áll rendelkezésünkre, azonban a vásárlók számára egyre fontosabb a természetes, kíméletes feldolgozási technológiákkal előállított, tartósítószer-mentes élelmiszerek fogyasztása. Az élelmiszeripar egyik lehetősége ilyen termékek előállítására a biológiai kontroll alkalmazása [12]. A fogyasztók a „biokontroll” megközelítést azonban

<sup>1</sup> Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

<sup>1</sup> Budapest Corvinus University Faculty of Food Sciences, Department of Microbiology and Biotechnology

csak abban az esetben fogadják el, amennyiben természetesen előforduló mikroorganizmusokat és/vagy azok antimikrobás metabolitjait használják az élelmiszerek minőségének vagy biztonságának fokozására. A potenciálisan antagonistá hatású mikroorganizmusokat, amelyeket biokontroll szervezetekként szeretnénk alkalmazni, a természetes környezetünkben, az állati vagy növényi élelmiszer alapanyagokon, illetve alapanyagokban érdemes keresnünk.

### 3. A biokontroll definíciója

A biológiai kontroll tulajdonképpen egy meghatározott szervezet alkalmazása egy másik szervezet populáció sűrűségének csökkentése érdekében, így magába foglalja az állatok, a gyomnövények és a megbetegedéseket okozó organizmusok elleni küzdelmet [2]. A biológiai kontroll során tehát élő szervezeteket – baktériumokat, gombákat, nematódákat, rovarokat, atkákat, illetve bizonyos esetekben vírusokat – alkalmazunk [6] más szervezetek gátlására, de természetes eredetű kémiai vegyületek használatát – mint a növényi extraktumok és a szemiokemikáliák (a biokommunikációban részt vevő molekulák) – szintén engedélyezik biokontrollként való alkalmazásra.

### 4. A biokontroll és a „postharvest”

Az élelmiszeriparban a biokontroll mechanizmussal kórokozók, illetve romlást okozó szervezetek tevékenységét szabályozhatjuk vagy gátolhatjuk. A zöltségek és gyümölcsök betakarítás utáni (postharvest) veszteségének csökkentésére kifejlesztett eljárások között jelentős szerepet tölt be a biokontroll, mint lehetséges alternatív módszer. Már az 1990-es évek elején piacra került a Bio-Save elnevezésű, *Pseudomonas syringae* baktériumot tartalmazó készítmény, amelyről kimutatták, hogy hatékony védelmet nyújt számos zöltség és gyümölcs tárolás során bekövetkező, gombák által okozott megbetegedés ellen (<http://www.jetharvest.com/biosave.html>). A betakarítás, valamint a gyümölcsök további kezelése során keletkező sérülések megvédhetők a sebeket fertőző gombákkal szemben, amennyiben az alkalmazandó biokontroll hatású mikroorganizmus számára megteremtjük szaporodásának optimális feltételeit. Ez elérhető a környezet befolyásolása révén, azaz a hőmérséklet, a nedvességtartalom, vagy akár a gázösszetétel változtatásával. Mivel igen nehéz olyan mikroorganizmust szelektálni, amely önmagában képes többféle káros mikroba szaporodását gátolni, ezért gyakran alkalmazzák különböző, szinergista hatású mikrobák keverékét biokontroll céllal. Az antagonistá mikroorganizmusok fiziológiai tulajdonságainak változtatásával megnövelhető az ellenálló képességük bizonyos ökológiai tényezőkkel szemben, ami különösen fontos egy folyamatosan változó környezetben alkalmazandó biokontroll törzs esetében, továbbá fokozható a törzsek biokontroll mechanizmusa is [10].

Ma már számos olyan publikációval találkozhatunk a nemzetközi szakirodalomban, amelyek tárgyköre és

célkitűzése a betakarítás utáni veszteségek csökkentése gátló hatással rendelkező mikroorganizmusok segítségével [10], [5], [15]. Hazánkban is több kutatócsoport foglalkozott és foglalkozik ma is (így a Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszéke) a gazdasági károk csökkentése érdekében olyan biokontroll hatású mikrobák izolálásával, szelektálásával és jellemzésével, amelyek a tárolás során bekövetkező romlási folyamatokat indukáló káros mikroszervezetek szaporodását és élettevékenységét képesek megakadályozni [17], [18].

### 5. Biológiai kontroll mechanizmusok

A biológiai kontroll az egymásra ható szervezetek kölcsönhatásain alapszik, ezért a kutatások elsősorban a különböző kísérleti körülmények között működő mechanizmusok jellemzésére fókuszálnak. Az élelmiszeriparban a baktériumok ellen alkalmazható biológiai kontrollok és biokontroll mechanizmusok között meg kell említeni (1) a bakteriofágokat, (2) a ragadozó baktériumokat, (3) a mikroorganizmusok közötti versengést, (4) a védőkultúrák használatát, (5) az antimikrobás metabolitok felhasználásának lehetőségét, és (6) a „quorum sensing” mechanizmust.

#### 5.1. Élelmiszer eredetű patogén baktériumok gátlása bakteriofágokkal

A bakteriofágok vagy fág-termékek alkalmazása az élelmiszerek előállításában csak nemrég vált az élelmiszeripar egyik lehetőségévé, mint új biokontroll módszer a nemkívánatos patogének gátlására főként a friss és fogyasztásra kész élelmiszerek biztonságának fokozás érdekében. Míg várható, hogy egyre több fejlesztés alatt álló fág készítmény válik elérhetővé a jövőben, számos kérdés vetődik fel az ilyen termékek alkalmazásával – az azonnali és hosszú távú hatékonysággal, a fogyasztók biztonságával és az alkalmazás lehetőségével – kapcsolatban.

A bakteriofágok baktériumokat fertőző vírusok, amelyek csak a specifikus gazdát képesek megfertőzni, és csak abban képesek szaporodni. A gazdaspecifikusság általában törzs vagy faj szinten jellemző, azonban ritkán nemzetség szinten is megfigyelhető. A bakteriofágok ezen specifikussága használható fel a kórokozó baktériumok elleni védekezésben. Alkalmazásuk azonban csak bizonyos feltételek mellett lehetséges: a baktériumnak és a bakteriofágnak egyszerre kell ugyanazon a helyen lennie, másrészt a gazdának érzékenynek kell lennie az alkalmazandó bakteriofágra [8]. A fágfertőzés során a baktériumot megtámadó vírus nukleinsava bejut a gazdasejtbe annak sejtfalán keresztül, majd a gazdasejt által a vírus nukleinsava alapján létrehozott új fágok (úgynevezett lítikus fágok) a fertőzést követően hamarosan elpusztítják a baktériumot. A gazdasejtben keletkező körülbelül 100 új vírus partikulum a sejtfal lebontásával kiszabadul a sejtből (sejtlízis), és valamennyi képes lesz újabb baktérium sejteket megfertőzni [13].

A fertőző betegségek elleni küzdelemben a fágte-

# Potential application areas of biological control for the inhibition of pathogenic bacteria of food origin

Ágnes Belák<sup>1</sup>

## 1. Summary

Today, food safety is already a known and well-defined concept for consumers. In order to maintain their health, they pay more and more attention to the consumption of good quality food rich in vitamins and minerals, and it is also extremely important for them that the food consumed does not cause any health damages. Current trends have always had an effect on the dietary habits of consumers, therefore, the interest in ready-to-use foods produced with minimal processing increased significantly in recent years. However, pathogenic microorganisms causing serious illnesses are often contained in these products, and so their consumption can lead to even death, in more severe cases. Application of biological control as an alternative technology can contribute to putting safer products on the consumer's table, containing no chemical preservatives.

## 2. Introduction

Consumption of foods contaminated with pathogenic microorganisms can lead to serious illnesses, even – in severe cases – to death. In addition to these health risks, food-borne pathogenic microorganisms can also cause considerable economic damages. Therefore, it is an important task to perform an in-depth analysis of the proliferation of pathogenic bacteria and factors influencing it, in order to protect the health of consumers and to reduce economic losses. Of ecological factors influencing proliferation, the composition and size of microbial populations and the interactions of the members of the population have great significance, with respect to the growth, survival and virulence of pathogenic bacteria.

Pathogenic bacteria are generally present in foods in small numbers, but even at low cell concentrations, they can cause illnesses with severe symptoms. Pathogenic bacteria that can cause enteral diseases (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*), or more severe illnesses affecting the nervous system (*Listeria monocytogenes*) can often be detected in food raw materials of both animal and vegetable origin. Since fruits and vegetables are, in many cases, consumed raw, the microbiological risk of these foods is very high. By adhering to surfaces, or even penetrating plant tissues, pathogenic bacteria can survive procedures aimed at reducing microbial counts before consumption, they can enter the human body, and after proliferation they can cause severe symptoms. However, penetration of plant tissues by microorganisms and their persistence is not a well-known process. Since the discovery of endophytic microorganisms (1904), several studies have been performed in order to determine how microorganisms are able to penetrate tissues, and what kind of relationship they establish with the host organism. The presence of *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* and *Cronobacter sakazakii* has already been detected in plant tissues, among others [16] (Strobel & Daisy, 2003), which means that pathogenic bacteria can also internalize plant tissues, and they can survive there as endophytes [3], [1] (Berg et al., 2005; Ansingkar & Kulkarni, 2010).

This means that protection against human pathogens is an important task, for both food safety and human health reasons. There are many traditional and modern technological procedures available to suppress pathogens and to preserve foods, but it has become increasingly important for customers to consume natural foods free of preservatives, that were produced using gentle processing technologies. One of the possibilities the food industry can use to produce such products is biological control [12]. However, the “biocontrol” approach is only accepted by consumers if naturally occurring microorganisms and/or their antimicrobial metabolites are used to improve the quality or increase the safety of foods. One should look for potentially antagonistic microorganisms that can be used as biocontrol organisms in our natural surroundings, on or in food raw materials of animal or plant origin.

## 3. Definition of biocontrol

Biological control is basically the application of a specific organism in order to decrease the population density of another organism, thus including the fight against animals, weeds and pathogenic organisms [2]. So, during biological control, living organisms – bacteria, fungi, nematodes, insects, mites or, in certain cases, viruses – are used to inhibit other organisms [6], but the use of chemical compounds of natural origin – such as plant extracts and semiochemicals (molecules participating in biocommunication) – as biocontrol agents is also permitted.

## 4. Biocontrol and „postharvest”

In the food industry, the biocontrol mechanism is used to regulate or suppress the activities of pathogens or spoilage organisms. Among the procedures developed to control postharvest losses of fruits and vegetables, a significant role is played by biocontrol, as a possible alternative method. The product Bio-Save, containing the bacterium *Pseudomonas syringae* was already launched at the beginning of the 1990s, which was shown to provide effective protection against diseases caused by fungi during the storage of several fruits and vegetables (<http://www.jetharvest.com/biosave.html>). Injuries arising during the harvest and subsequent handling of the fruits can be protected against fungi infecting the wounds if optimal proliferation conditions are established for the microorganism to be used as a biocontrol agent. This may be achieved by influencing the environment, i.e. changing the temperature, the humidity or even the gas composition. Since it is very difficult to select a microorganism that can suppress the proliferation of a mixture of several harmful microbes in itself, therefore, a mixture of different microbes with synergistic effects are often used in biocontrol. By changing the physiological properties of antagonistic microorganisms, their resistance to certain ecological factors can be increased, which is especially important in the case of biocontrol strains to be used in a constantly changing environment, and the biocontrol mechanism of the strains can be improved as well [10].

Nowadays, one can find many publications in the international literature that deal with and are aimed at minimizing postharvest losses with the help of microorganisms with inhibitory effects [10], [5], [15]. There have been several research groups in Hungary as well (such as the Department of Microbiology and Biotechnology of Corvinus University of Budapest) working on the isolation, selection and characterization of biocontrol microbes that can suppress the proliferation and life activities of harmful microorganisms inducing spoilage processes during storage, in order to reduce economic damages [17], [18].

rápia alkalmazását nem sokkal a fágok felfedezését követően javasolták, és kezdtek el alkalmazni. Az antibiotikumok széles körben történő felhasználása azonban számos országban háttérbe szorította a bakteriofágokkal történő kezeléseket. Azokban az országokban viszont, ahol a fágterápiával kapcsolatos kutatások tovább folytak, a fágokat széles körben alkalmazták és alkalmazzák mindmáig. A bakteriofágok alkalmazása patogének gátlására az élelmiszeriparban hasonlóan hasznos lehet. Ez különösen igaz olyan patogén baktérium, mint a *Listeria monocytogenes* esetében, amely a gazdaszervezetbe történő bejutást követően intracelluláris patogénként viselkedik, így elérhetlenné válik az immunrendszer vagy a liszteriózisban szenvedő betegeknél beadott bakteriofágok számára [8]. Nem meglepő tehát, hogy az első élelmiszeriparban alkalmazható fágkészítményt, a Listex<sup>TM</sup>P100-at *Listeria* gátlására fejlesztették ki sajtokban és húskészítményekben [13]. Ma már számos más patogén baktérium, így *Campylobacter* [4], *Salmonella* [20], *Escherichia coli* [14] vagy *Staphylococcus aureus* esetében találkozhatunk kidolgozott biológiai kontroll folyamatokkal, amelyben bakteriofágokat alkalmaznak a kórokozók gátlására, illetve elpusztítására.

Az élelmiszerek esetén alkalmazható (biokontroll) fágokkal szemben támasztott követelmények az alábbiak: (i) széles gazdaspektrum (képesek legyenek megfertőzni egy adott faj és/vagy nemzetség tagjait), (ii) kizárólag lítikus (virulens) fágok alkalmazhatók, (iii) előállítás nem-patogén gazdasejtben történő felszaporítással, (iv) a teljes genom szekvencia ismerete, (v) a nem vírus eredetű (bakteriális) DNS transzformációjának hiánya, (vi) patogenitást vagy potenciális allergén fehérjéket kódoló gének teljes hiánya, (vii) a kedvezőtlen élettani hatások hiányának kimutatása etetési vizsgálatokkal (nem lehet toxikus az emberi szervezetre), (viii) GRAS státusz, (ix) stabilitás a tárolás és alkalmazás során, valamint (x) alkalmas legyen nagy mennyiségben történő előállításra (léptéknöveléssel) [8].

## 5.2. Bakteriális ragadozók

Az élővilágban számos különleges morfológiájú, esetleg jellegzetes helyváltoztatásra képes (például csúszva mozgó), vagy akár ragadozó életmódot folytató baktériummal találkozhatunk. A Gram-negatív baktériumok egyik jellegzetes nemzetsége a *Bdellovibrio*, amelynek tagjai ragadozó életmódot folytatnak más Gram-negatív baktériumokon. A *Bdellovibrio*-k behatolnak a gazdasejt periplazmájába, majd elszaporodva a citoplazmában lizálják a gazda baktériumot, hogy újabb sejteket megtámadva folytathassák életciklusukat. A dimorf *Bdellovibrio*-k életciklusa kétfázisú. A támadási fázisban a kisméretű, flagellummal rendelkező sejtek gyorsan haladva keresnek gazdasejteket, a találkozás azonban véletlenszerű, mivel kemotaxist ez idáig nem mutattak ki ezeknél a ragadozó baktériumoknál. A találkozást és a megtapadást követően a ragadozó a gazdasejt periplazmájába penetrál, miközben elveszíti hosszú flagellumát. A növekedési fázisban a megtámadott

sejt az úgynevezett bdelloplaszt állapotba kerül. Ebben a „bezárt” állapotban a kis *Bdellovibrio* sejt egy szeptumok nélküli filamentummá alakul, majd a körülbelül 45 percre tartó lag fázist követően megindul a DNS replikáció, amely néhány órán keresztül, a sejt növekedésével együtt zajlik. Ezután a filamentum többszöri hasadással új sejtekre tagozódik, majd az utódok kiszabadulnak a gazdaként szolgáló, megtámadott sejtéből. A bdelloplasztban belül a *Bdellovibrio* védve van a fotooxidációtól valamint a fág-támadástól, továbbá megnövekedett rezisztencia jellemzi a szennyező anyagokkal szemben [11].

A *Bdellovibrio*-k gyakran megtalálhatók a környezetben, és mivel széles gazdaspektrummal rendelkeznek, különösen fontosak lehetnek a Gram-negatív patogének, így az élelmiszerekben valamint vizekben előforduló *Salmonella*-k vagy az *E. coli* O157:H7 elleni küzdelemben [13]. Fratamico és Whiting [7] különböző patogén és romlást okozó baktériumok, így például patogén *E. coli* ellen alkalmazták hatékonyan a *Bdellovibrio bacteriovorus* fajt.

## 5.3. Versengés

Az elmúlt néhány évben a fogyasztók szimpátiája a természetes élelmiszertartósítási technológiák iránt megnövekedett, így a környezetünkben megtalálható antagonisták mikroorganizmusok vagy azok metabolitjainak alkalmazása egyre nagyobb jelentőségre tesz szert az élelmiszeriparban. Ezek a mikrobák a megtámadás vagy megsemmisítés helyett az adott élőhelyről vagy ökológiai egységből kiszorítják a patogéneket a versengő kirekesztésre (competitive exclusion) révén úgy, hogy túlnövik azokat, így kedvezőtlen feltételeket teremtenek számukra a szaporodáshoz, illetve életfolyamataik fenntartásához.

A versengő mikrobióta tagjai azonban többféle módon is képesek szabályozni vagy gátolni a kórokozók élettevékenységét, így a tápanyagért történő versengéssel, gátlóanyagok termelésével, az immunrendszer stimulálásával és/vagy a specifikus kötőhelyekért történő versengéssel. A versengő kirekesztésre képes mikrobák esetében előnyös, ha azok jól tapadnak az epiteliális sejtek felületéhez a megfelelő kolonizáció érdekében [13].

Kereskedelmi forgalomban kapható a kanadai Can-Biocin cég Procin<sup>®</sup> nevű terméke (<http://www.can-biocin.ca/index.html>), amely az állatok egészségének megőrzésére alkalmazható készítmény. A termék az állatok emésztőrendszerében természetesen is megtalálható tejsavbaktériumokat tartalmaz, és sertések esetében jól alkalmazható a patogén *E. coli* ellen. Ugyanakkor az élelmiszerek biztonságának növelése érdekében kifejlesztésre került a Micocin<sup>®</sup> elnevezésű, szintén természetesen előforduló tejsavbaktériumokat tartalmazó készítmény, amely például vákuumcsomagolt, fogyasztásra kész húskok esetében természetes védelmet biztosít a kórokozók, így például a *Listeria monocytogenes* ellen.



## All the ingredients for the safest, highest quality food and beverages.

Laboratories that make Waters an essential part of their food and beverage testing process always know what they're getting. Innovative technologies that deliver safe, quality products more efficiently and cost effectively. Attribute it to a 50-year focus on innovation and a commitment to helping laboratories in every way.

Analytically, scientifically, operationally. In the end, it's all about stocking shelves around the globe with food and beverages that taste great every time. **To discover what's possible in your world, visit [waters.com/food](http://waters.com/food).**

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Pharmaceutical & Life Sciences | Food | Environmental | Clinical | Chemical Materials

#### 5.4. Védőkultúrák

A mikroorganizmusok élettevékenységéből származó előnyök kiaknázása az élelmiszerek tartósításában nem új keletű. Őseink számos élelmiszerüket mikroorganizmusok segítségével, azaz erjesztéssel állították elő, így növelve meg eltarthatóságukat és élvezeti értéküket. A tejsavbaktériumok védőkultúráként való alkalmazása az élelmiszerek biztonságának fokozása érdekében régóta a figyelem középpontjában áll. Felhasználásuk során fontos paraméter a megfelelő gátló hatás kiváltásához szükséges sejtmennyiség, valamint az érzékszervi tulajdonságokra kifejtett lehetséges hatás.

Számos élelmiszer, így húsok, halak, zöldségek és tejtermékek esetében alkalmaztak már tejsavbaktériumokat az eltarthatósági idő növelésére, valamint a termék biztonságának fokozására. Antimikrobás hatásuk a tejsav-, valamint a különböző antimikrobás vegyületek (például bakteriocinek) termelésének tulajdonítható. A tejsavbaktériumokhoz hasonlóan számos *Bifidobacterium* törzset használtak már tenger gyümölcseinek, halak, baromfi termékek vagy tejtermékek eltarthatósági idejének meghosszabbítására, valamint a patogének elleni védelem elérésére. Az eltarthatósági idő az élelmiszer típusától és az alkalmazás módjától függően akár 3-tól 14 napig is növelhető, továbbá más technológiákkal kombinálva, mint a kálium-szorbát adagolás, tovább fokozható [13]. Ugyan a tejsavbaktériumok jelentős diverzitása jellemzi a friss zöldségeket és gyümölcsöket (elsősorban *Lactobacillus* és *Leuconostoc*, míg kisebb számban *Weissella*, *Enterococcus* és *Lactococcus* törzsek fordulnak elő) Trias és munkatársai [19] csak meglehetősen kis arányban találtak közöttük élelmiszer eredetű patogén baktériumokat gátló törzseket. Friss zöldségekről és gyümölcsökről izolált tejsavbaktériumok közül elsősorban a *Leuconostoc* nemzetség törzsei esetében tapasztaltak jelentős patogén elleni gátló hatást. A védőkultúrák mellett, hogy kórokozó elleni hatással rendelkeznek, nem veszélyeztethetik a fogyasztó egészségét, illetve sok esetben előnyösen befolyásolják a fogyasztó egészségét. A probiotikumok jótékony hatásának köszönhetően a szervezetünk védekező képessége a kórokozó mikrobákkal szemben fokozódik.

#### 5.5. Antimikrobás metabolitok

Az elmúlt néhány évtizedben nyert tapasztalataink a fermentációs folyamatokban részt vevő starterkultúrákkal kapcsolatban hozzájárultak ahhoz a nagyon fontos felismeréshez, hogy a tejsavbaktériumok számos fiziológiai tulajdonsága hozzájárul a patogén baktériumok gátlásához, továbbá a termékek eltarthatósági idejének, valamint érzékszervi tulajdonságainak szabályozásához. A tejsavbaktériumok által termelt metabolitok, így az ecetsav, a diacetil/acetoin, a metántiol, vagy a H<sub>2</sub>S a termék jellegzetes aromájának kialakításához járulnak hozzá, míg más anyagcseretermékek (tejsav, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a termék eltarthatóságának növeléséhez szükségesek. A szerves savak (a tejsav és az ecetsav) a rothasztó Gram-negatív baktériumok

és gombák, a hidrogén peroxid, a laktoperoxidáz és a lizozim a patogének és romlást okozók ellen nyújtanak védelmet. A kis molekulájú metabolitok (reuterin, diacetil és zsírsavak), valamint a bakteriocinek szintén sokféle baktérium szaporodását gátolják [9].

Az antimikrobás metabolitok között kell megemlíteni azokat a kelátképző vegyületeket, más néven sziderofórokat is, amelyek ugyan a patogén baktériumok esetében gyakran, mint virulencia faktorok kerülnek megemlítésre, bizonyos esetekben azonban jelentős mértékben képesek gátolni azok szaporodását. A természetben gyakorta megtalálható *Pseudomonas* nemzetség számos törzséről megállapították, hogy antagonistá hatással rendelkeznek patogén baktériumokkal szemben. A gátló hatás az antibiotikumok mellett sok esetben a sziderofóroknak tulajdonítható, amely vegyületek képesek megkötni a patogének életműködéséhez elengedhetetlen fémionokat, köztük elsődlegesen a vasat, így gátolva a kórokozók szaporodását.

#### 5.6. Quorum sensing

A baktériumok folyamatosan változó komplex ökológiai rendszerekben élnek. Ahhoz, hogy a változásokat túlélhessék, érzékelniük és értelmezniük kell a környezetüket, amelyre a szaporodás fokozásával vagy adaptív válaszok kiváltásával reagálnak. Azok a baktériumok, amelyek nem képesek adaptálódni, vagy reagálni a környezeti változásokra, elpusztulnak, azonban megfelelő reakciók esetében adaptálódnak a változó feltételekhez. Ez különösen igaz azokra a baktériumokra, amelyek feldolgozott élelmiszerekben fordulnak elő. Továbbá egy-egy baktérium önmagában nem, csak közösségben képes az adott környezetben megélni, amely gyakran más baktérium fajtákat, vagy akár más mikroorganizmusokat, így fonalgombákat vagy élesztőgombákat is magába foglal. A sejtjelzés (cell signaling) vagy quorum sensing (QS) ezeken a közösségeken belül egy jól megalapozott jelenség, amely kis jelző molekulák (úgynevezett autoinducerek) detektálása által irányítja a baktériumok összehangolt viselkedését. A quorum sensing lehetőség ad a baktériumok számos tevékenysége esetén a sejtsűrűség függvényében történő szabályozásra, így a felülethez való tapadásra, a biofilm képzésre, a virulencia faktorok kifejeződésére, vagy akár másodlagos anyagcsere termékek előállítására. Sok QS által irányított mikrobás tevékenység vesz részt az élelmiszerek romlásában, valamint a patogének élelmiszer-mátrixban való túlélésében [13].

A baktériumok quorum sensing folyamatáról részletes és nagyon jó áttekintés nyújt Farkas József és Mohácsiné Farkas Csilla 2014. márciusában megjelent tanulmánya az Élelmiszervizsgálati Közlemények egy korábbi számában [22].

#### 6. Következtetések

A mikroorganizmusok egymásra gyakorolt hatásának tanulmányozása, mélyrehatóbb megismerése, illetve

## 5. Biological control mechanisms

Biological control is based on the interactions of organisms mutually affecting each other, therefore, research is mainly focused on the characterization of mechanisms operating under different experimental conditions. Among biological controls and biocontrol mechanisms that can be applied against bacteria in the food industry, the following should be mentioned: (1) bacteriophages, (2) predatory bacteria, (3) competition among microorganisms, (4) the application of protective cultures, (5) the possible use of antimicrobial metabolites, and (6) the mechanism called „quorum sensing”.

### 5.1. Suppression of food-borne pathogenic bacteria with bacteriophages

The application of bacteriophages or phage products has only recently become one of the possibilities of the food industry as a new biocontrol method to suppress unwanted pathogens in the production of foods, mainly to increase the safety of fresh and ready-to-use foods. While it is expected that many more phage products, currently in the developmental stage, will become available in the future, there are several questions that need to be answered about the use of such products, such as immediate and long-term efficiency, consumer safety and possible applications.

Bacteriophages are viruses infecting bacteria that can only infect specific hosts and can only proliferate in them. Host specificity usually means a strain or a species, but can rarely be observed at the genus level. This specificity of bacteriophages can be used in the defense against pathogenic bacteria. However, they can only be used if certain conditions are met: on the one hand, the bacterium and the bacteriophage have to be in the same place at the same time, and on the other hand, the host has to be sensitive to the bacteriophage to be applied [8]. During phage infection, the nucleic acid of the virus attacking the bacterium enters the host cell through its cell wall, and then, soon after the infection, the new phages produced by the host cell based on the nucleic acid of the virus (the so-called lytic phages) destroy the bacterium. The approximately 100 new virus particles produced by the host cell are released by the decomposition of the cell wall (cell lysis), and all of them are capable of infecting further bacterial cells [13].

In the fight against infectious diseases, the application of phage therapy was suggested soon after the discovery of phages, and its use indeed began. Nevertheless, bacteriophage treatment was overshadowed in several countries by the widespread use of antibiotics. However, in those countries where research on phage therapy continued, phages have been widely used and are still used today. The application of bacteriophages in the food industry to suppress pathogens can be similarly useful. This is especially true in the case of the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes*, which behaves as an intracellular pathogen following its entry into the host cell, so that it becomes inaccessible to the immune system or to bacteriophages administered to patients suffering from listeriosis [8]. It is not surprising then that the first phage product which could be used in the food industry, Listex™P100, was developed to inhibit *Listeria* in cheese and meat products [13]. Today, there are established biological control processes for several other pathogenic bacteria, such as *Campylobacter* [4], *Salmonella* [20], *Escherichia coli* [14] or *Staphylococcus aureus*, in which bacteriophages are used to inhibit or destroy pathogens.

Requirements for (biocontrol) phages to be used for

foods are as follows: (i) broad host spectrum (to be able to infect members of a given species and/or genus), (ii) only lytic (virulent) phages can be used, (iii) produced by proliferation in non-pathogenic host cells, (iv) knowledge of complete genome sequence, (v) lack of transformation of non-viral origin (bacterial) DNA, (vi) complete lack of genes coding pathogenicity or potentially allergenic proteins, (vii) demonstration of a lack of adverse physiological effects by feeding studies (cannot be toxic to the human body), (viii) GRAS status, (ix) stability during storage and application, and (x) suitability for large scale production (with upscaling) [8].

### 5.2. Bacterial predators

One can encounter several bacteria in biology that have special morphologies, can move in a characteristic way (for example gliding bacteria), or even ones that practice a predatory lifestyle. A characteristic genus of Gram-negative bacteria is *Bdellovibrio*, whose members prey on other Gram-negative bacteria. *Bdellovibrio* bacteria enter the periplasm of the host cell, proliferate in the cytoplasm, lyse the host bacterium, and then attack new cells to continue their life cycles. Dimorphic *Bdellovibrios* have a two-phase life cycle. In the attack phase, small cells possessing flagella move fast in search of host cells, but encounters are random, since chemotaxis has not been detected so far in these predatory bacteria. Following the encounter and adhesion, the predator penetrates into the preplasm of the host cell, while losing its long flagellum. In the growth phase, the cell that was attacked enters the so-called bdelloplast state. In this „closed” state, the small *Bdellovibrio* cell turns into a filament without septa and, after a lag phase of approximately 45 minutes, DNA replication commences, which then goes on for several hours, together with cell growth. Following this, the filament divides into new cells by multiple fissions, and the progeny are released from the host cell that was attacked. Within the bdelloplast, *Bdellovibrio* is protected from photooxidation and from phage attacks, and it is also characterized by an increased resistance to contaminants [11].

*Bdellovibrios* are often found in the environment, and since they have a broad host spectrum, they can be especially important in the fight against Gram-negative pathogens, such as *Salmonella* or *E. coli* O157:H7 occurring in foods and waters [13]. The species *Bdellovibrio bacteriovorus* was used effectively by Fratamico and Whiting [7] against different pathogenic and spoilage bacteria, such as pathogenic *E. coli*.

### 5.3. Competition

In recent years, there has been an increased consumer sympathy for natural food preservation technologies, so the significance of the application of antagonist microorganisms found in our environment or their metabolites has also been increasing in the food industry. Instead of attacking or destroying them, these microbes displace pathogens from the given habitat or ecological unit by outgrowing them (competitive exclusion), and thus establishing unfavorable conditions for their proliferation and the maintenance of their life processes.

However, members of the competing microbiota are able to regulate or suppress the life activities of pathogens in several ways, such as by competing for nutrients, by producing inhibitors, by stimulating the immune system and/or by competing for specific binding sites. For microbes capable of competitive exclusion it is advantageous, for proper colonization, if they can adhere well to the surface of epithelial cells [13].



új, eddig még nem vizsgált gátló hatással rendelkező mikroorganizmusok izolálása a környezetünkben vagy élelmiszereinkből fontos lehet a gyakran súlyos megbetegedéseket okozó patogén baktériumok gátlásában. Mivel a fogyasztók a biológiai kontroll fogalmával kezdenek megismerkedni és megbarátkozni, egyre nagyobb érdeklődés tapasztalható a természetes tartósítási eljárásokkal készített, mikrobákat vagy azok anyagcsere termékeit felhasználó, kémiai vegyületektől mentes élelmiszer előállításai módszerek iránt. Ugyan a biokontroll alkalmazása nem újkeletű az élelmiszeriparban, mégis a fogyasztók ismereteinek bővítése, valamint a szélesebb körben történő elfogadás elősegítése céljából többet kellene hallaniuk a hasznos mikroorganizmusokról, illetve az általuk előidézett kedvező élettani hatásokról egészségünk védelme érdekében.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Munkámat a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## 8. Irodalomjegyzék / References

[1] Ansingkar, V., Kulkarni, N. (2010): Incidences of Endophytic Human Pathogens in Fresh Produce. *Webmed Central Microbiology*, 1 (12) WMC001299

[2] Bale, J.S., van Lenteren, J.C., Bigler, F. (2008): Biological Control and Sustainable Food Production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363 p. 761–776

[3] Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. (2005): The Rhizosphere as a Reservoir for Opportunistic Human Pathogenic Bacteria. *Environmental Microbiology*, 7 (11) p. 1673–1685

[4] Connerton, P.L., Timms A.R., Connerton, I.F. (2011): Campylobacter Bacteriophages and Bacteriophage Therapy. *Journal of Applied Microbiology*, 111 (2) p. 255–265

[5] Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson, C. (2009): Twenty Years of Postharvest Biocontrol Research: Is it Time for a New Paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52 p. 137–145

[6] Ehlers, R.-U. (2011): Regulation of Biological Control Agents and the EU Policy Support Action REBECA. In: Ehlers, R.-U. (ed.) *Regulation of Biological Control Agents*. Chapter 1 p. 3-23

[7] Fratamico, P. M., Whiting, R. C. (1995): Ability of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J to Lyse Gram-Negative Food-Borne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Journal of Food Protection* 58 (2) p. 160-164

[8] Hagens, S., Loessner, M.J. (2010): Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11 p. 58-68

[9] Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. (1995): Biological Preservation of Foods with Reference to

Protective Cultures, Bacteriocins and Food-grade Enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24 p. 343-362

[10] Janisiewicz, W. J., Korsten, L. (2002): Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40 p. 411–441

[11] Jurkevitch, E. (2006): The Genus *Bdellovibrio*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (eds). *Prokaryotes*, Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass, Chapter 3.4.2. p. 12-30

[12] Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C.P., Camp, M.J. (2006): Biocontrol of the Food-borne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Poona on Fresh-cut Apples with Naturally Occurring Bacterial and Yeast Antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2), p. 1135–1140

[13] McIntyre, L., Hudson, J.A., Billington, C., Withers, H. (2007): Biocontrol of Foodborne Bacteria: Past, Present and Future Strategies. *Food New Zealand*, 7 (5) p. 25-36

[14] McLean, S. K., Dunn, L. A., Palombo, E.A. (2013): Phage Inhibition of *Escherichia coli* in Ultrahigh-temperature-treated and Raw Milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10 (11) p. 956-962

[15] Sharma, R. R., Singh, D., Singh, R. (2009): Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables by Microbial Antagonists: A Review. *Biological Control* 50 p. 205–221

[16] Strobel, G., Daisy, B. (2003): Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4) p. 491–502

[17] Taczman-Brückner, A., Mohácsi-Farkas, Cs., Balla, Cs., Kiskó, G. (2005a): Comparison of Biocontrol Activity of *Kluyveromyces lactis* with Other Yeast Strains Against *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 34 (1) p. 71-80

[18] Taczman-Brückner, A., Mohácsi-Farkas, Cs., Balla, Cs., Kiskó, G. (2005b): Mode of Action of *Kluyveromyces lactis* in Biocontrol of *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 34 (2) p. 153-160

[19] Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., Montesinos, E. (2008): Bioprotection of Golden Delicious Apples and Iceberg Lettuce Against Foodborne Bacterial Pathogens by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123 p. 50–60

[20] Woolston, J., Parks, A. R., Abuladze, T., Anderson, B., Li, M., Carter, C., Farris Hanna, L., Heyse, S., Charbonneau, D., Sulakvelidze, A. (2013): Bacteriophages Lytic for *Salmonella* Rapidly Reduce *Salmonella* Contamination on Glass and Stainless Steel Surfaces. *Bacteriophage*, 3 (3), e25697-1–e25697-6

[21] Yoon, H., Yun, J., Lim, J.-A., Roh, E., Jung, K.-S., Chang, Y., Ryu, S., Heu, S. (2013): Characterization and Genomic Analysis of Two *Staphylococcus aureus* Bacteriophages Isolated from Poultry/livestock Farms. *Journal of General Virology*, 94 p. 2569–2576

[22] Farkas, J., Mohácsiné Farkas, Cs. (2014): Baktériumok kommunikációja és annak élelmiszer-tudományi jelentősége. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* (60) 1 p. 38-43

There is a commercially available product named Procin® of the Canadian company CanBioicin (<http://www.canbiocin.ca/index.html>), which can be used to preserve the health of animals. This product contains lactic acid bacteria that also occur naturally in the digestive tract of animals, and it can be used effectively against pathogenic *E. coli* in the case of swine. The product named Micocin®, also containing naturally occurring lactic acid bacteria, was developed to increase the safety of foods, and it provides natural protection against pathogens, such as *Listeria monocytogenes* in the case of, for example, vacuum-packed, ready-to-eat meats.

#### 5.4. Protective cultures

Exploitation of the benefits arising from the life activities of microorganisms in food preservation is not a new idea. A number of foods were produced by our ancestors with the help of microorganisms, i.e. by fermentation, thus increasing their shelf-life and their enjoyment value. Attention has been centered on the use of lactic acid bacteria as a protective culture to increase food safety for a long time. One of the important parameters during their application is the cell quantity necessary to achieve proper inhibitory effect, and also their possible effect on sensory properties.

Lactic acid bacteria have been used for several foods, such as meats, fish, vegetables and dairy products, to increase shelf-life, and also to improve product safety. Their antimicrobial effect is due to the production of lactic acid and other antimicrobial compounds (e.g. bacteriocins). Like lactic acid bacteria, several *Bifidobacterium* strains have also been used to increase the shelf-life of fruits of marine, fish, poultry and dairy products, and to protect them against pathogens. Depending on the type of food and the method of application, shelf-life can be increased from 3 days to up to 14 days, and it can even be increased further by combination with other techniques, such as the addition of potassium sorbate [13]. Although fresh fruits and vegetables are characterized by a significant diversity of lactic acid bacteria (mainly *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, and, to a smaller extent, *Weissella*, *Enterococcus* and *Lactococcus* strains are present), only a few of them were found by Trias et al. [19] to inhibit strains of food-borne pathogenic bacteria. Of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables, significant pathogen inhibition effect was observed primarily in the case of strains of the genus *Leuconostoc*. In addition to their anti-pathogenic effect, consumer health is not endangered by protective cultures, moreover, in many cases they have beneficial effects. Due to the beneficial effects of probiotics, the body's capacity for defense increases.

#### 5.5. Antimicrobial metabolites

Our experience, obtained over the past few decades about starter cultures participating in fermentation processes, contributed to the very important discovery that many physiological properties of lactic acid bacteria promote the inhibition of pathogenic bacteria, and also the regulation of product shelf-life and sensory properties. Metabolites produced by lactic acid bacteria, such as acetic acid, diacetyl/acetoin, methanethiol or H<sub>2</sub>S, contribute to the characteristic aroma of the product, while other metabolites (lactic acid, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) are necessary to increase the shelf-life of the product. Organic acids (lactic acid and acetic acid) protect against Gram-negative putrefactive bacteria and fungi, while hydrogen peroxide, lactoperoxidase and lysozyme protect against pathogens and spoilage agents. Low molecular weight metabolites (reuterin, diacetyl and fatty acids) and bacteriocins also inhibit the proliferation of

several bacteria [9].

Among antimicrobial metabolites, also have to be mentioned chelating compounds, also known as siderophores, which are often listed as virulence factors in the case of pathogenic bacteria, but, in certain cases, they can inhibit their proliferation significantly. It has been determined about several strains of the genus *Pseudomonas*, often found in nature, that they possess antagonistic effects against pathogenic bacteria. In many cases the inhibitory effect, in addition to antibiotics, is attributed to the siderophores, which can bind metal ions, primarily iron, essential for the life activities of the pathogens, thus inhibiting the proliferation of the pathogens.

#### 5.6. Quorum sensing

Bacteria live in constantly changing complex ecological systems. In order to survive changes, they have to sense and interpret their environment, and react by increased proliferation or by producing adaptive responses. Bacteria that are unable to adapt or to respond to environmental changes perish, but if their reaction are appropriate, they adapt to changing conditions. This is particularly true for bacteria that are present in processed foods. Furthermore, an individual bacterium cannot survive alone, only as part of a community, in a given environment, often containing other bacterial species and even other microorganisms, such as filamentous fungi or yeasts. Cell signalling or quorum sensing (QS) within these communities is a well-established phenomenon, which directs coordinated behavior of bacteria by detecting small signal molecules (so-called autoinducers). For several bacterial activities, such as adhesion to surfaces, biofilm formation, expression of virulence factors or even the production of secondary metabolic products, quorum sensing allows for the regulation as a function of cell density. Many QS-controlled microbial activities are involved in the spoilage of foods, and also in the survival of pathogens in food matrices [13].

A detailed and excellent overview of the quorum sensing processes of bacteria are given in the paper of József Farkas and Csilla Mohácsiné Farkas, which appeared in a former issue of the Journal of Food Investigations [22].

#### 6. Conclusions

It can be important for the inhibition of pathogenic bacteria, often causing serious illnesses, to study the effects of microorganisms on each other, to obtain in-depth knowledge, and to isolate from our environment or from our foods microorganisms possessing new, not yet studied inhibitory effects. Since consumers begin to get to know and become familiar with the concept of biological control, there has been an increasing interest in foods produced by natural preservation processes that use microbes or their metabolites and are free of chemical compounds. Although application of biocontrol is not new to the food industry, in order to broaden consumer knowledge and achieve wider acceptance, people should hear more about useful microorganisms, and the beneficial physiological effect produced by them to protect our health.

#### 7. Acknowledgement

My work was subsidized by the TÁMOP with 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 identification number National Excellence Program developed for support and to make operate of national personnel student and researcher programs. The project has been realized with the donation of European Union with the collaborative support of European Social Foundation.