

Doktori értekezés tézisei

Dobó Viktória

Budapest

2025



**Aszalványok mikrobiótájának vizsgálata és
stressz hatások modellezése *Escherichia coli*-n**

Viktória Dobó

Budapest

2025

A doktori iskola

Megnevezés: Agrár- és Élelmiszertudományok Doktori Iskola

Tudományága: Élelmiszertudományok

Vezetője: **Prof. Dr. Kovács Melinda**
Egyetemi tanár, A Magyar Tudományos Akadémia Rendes Tagja

Témavezetők: **Dr. Belák Ágnes**
Egyetemi docens, PhD
Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Mohácsiné dr. Farkas Csilla
Egyetemi tanár, PhD
Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt években az aszalt gyümölcsök egyre nagyobb jelentőségre tettek szert a modern étrendben, az egészséges élelmiszerek iránti fogyasztói érdeklődés növekedése miatt. Az aszalt gyümölcsök koncentrált formái a friss gyümölcsöknek, amelyeket hagyományos módszerekkel, például napon szárítással, vagy korszerű mechanikus szárítókkal dolgoznak fel (Ringeisen et al., 2014). Bár az étrendi ajánlások a friss, szezonális termékeket hangsúlyozzák, több ország, köztük Litvánia és az Egyesült Királyság is az aszalt gyümölcsök napi fogyasztását javasolja (Web1). Európa klímája miatt a friss gyümölcsök egész évi elérhetősége korlátozott, így az aszalt gyümölcsök értékes alternatívát jelentenek. Ezek élelmi rostokban, vitaminokban, ásványi anyagokban és bioaktív vegyületekben is gazdagok, így asz aszaltványok támogatják az emésztést és az immunrendszer működését, valamint csökkentik a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázatát (Jeszka-Skowron et al., 2017; Rybicka et al., 2021; Alasalvar et al., 2023; Zeng et al., 2023).

A szárítási folyamat csökkenti a nedvességtartalmat és a vízaktivitást (a_w), ezzel gátolja a mikrobiális szaporodást és hosszabbítja meg a termékek eltarthatóságát (Średnicka-Tober et al., 2020). A hagyományos aszalt gyümölcsök nem tartalmaznak hozzáadott cukrot, míg mások, például a vörös áfonya vagy a mangó, ízesítés céljából édesítettek, ami tovább csökkenti a vízaktivitást (Alasalvar et al., 2020). Annak ellenére, hogy az a_w jellemzően kicsi (körülbelül 0,60 vagy annál kevesebb), az aszalt gyümölcsök nem mentesek a mikrobiális szennyeződéstől (Beuchat et al., 2011). Olyan kórokozók, mint a *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. és további patogének túlélhetnek ezen körülmények között. Ezen patogéneket kereskedelmi és házilag aszalt termékekből is egyaránt kimutatták (Risiquat, 2013; Ntuli et al., 2017; Canakapalli et al., 2021; Shah et al., 2022; Abed, 2025). Mivel az aszalt gyümölcsöket gyakran további feldolgozás nélkül fogyasztják, a mikrobiális és mikotoxin-szennyeződés továbbra is komoly élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent (Zakaria et al., 2015).

A mikrobák kimutatása hagyományosan tenyésztés-alapú módszereken alapul, amelyek több szelektív táptalajt, biokémiai tesztet, valamint fejlett, azonosításra alkalmas készülékeket, például MALDI-TOF MS-t is magukban foglalnak. A tenyésztésen alapuló megközelítések munkaigényesek, és alá is becsülhetik a mikroorganizmusok számát, mivel nem minden mikroba képes szaporodni standard laboratóriumi körülmények között (Biswas és Rolain, 2013). A tenyésztés-független módszerek, mint a 16S rDNS amplikon szekvenálás vagy a kvantitatív PCR (qPCR), lehetővé teszik a tenyészhető és tenyészhetetlen mikroorganizmusok közvetlen kimutatását élelmiszer-, környezeti vagy klinikai mintákból is. Ugyanakkor a DNS-kivonásához használt protokoll, a primer- és célgén-választás, valamint a referencia adatbázisok jelentősen befolyásolhatják a taxonómiai azonosítás pontosságát (O'Sullivan et al., 2011; Schoonbroodt et al., 2023). A két megközelítés kombinálása biztosítja a mikrobióta legteljesebb jellemzését.

A baktériumok dormanciáját különféle környezeti stresszhatások válthatják ki, például túl nagy vagy túl kicsi hőmérséklet, szárítás, nagy ozmotikus nyomás, tartósítószeresek, sugárzás, illetve ezek kombinációi, például fagyasztva szárítás (Fu et al., 2020; Li et al., 2020; Cai et al., 2022; Jayeola et al., 2022; König et al., 2023; Pazos-Rojas et al., 2023; Hu et al., 2024; Shangguan et al., 2025). A spórák és perzisztens sejtek mellett az élő de nem tenyészhető (VBNC) állapot különösen releváns, mivel a VBNC sejtek metabolikusan aktívak maradnak, de a standard laboratóriumi tenyésztéses módszerekkel nem mutathatóak ki. Kimutatásukhoz többek között molekuláris módszerekre, mint például a qPCR-re vagy a 16S rRNS szekvenálásra van szükség (Li et al., 2014).

Nagy ozmotikus nyomású környezetben (hiperozmotikus stressz) a baktériumoknak gyorsan kell alkalmazkodniuk a turgor nyomás és a sejten belüli hidratáció fenntartásához. Ennek ellensúlyozására a sejtek kompatibilis oldott anyagokat (ozmoprotektánsokat), például glicin betaint, karnitint, prolin betaint és trehalózt halmoznak fel (Breisch és Averhoff, 2020). Az *E. coli*-ban az ozmotikus stressz komplex választ vált ki, amely magában foglalja a génszabályozást, az anyagcsere folyamatok átrendeződését és a kompatibilis oldott anyagok felhalmozódást (Sévin és Sauer, 2014; Sun et al., 2019).

A gamma-sugárzás egy újabb, nem hőmérsékleten alapuló tartósítási módszer, amely nagy energiájú fotonokat (tipikusan Kobalt-60 vagy Cezium-137 forrásból) használ a mikroorganizmusok inaktiválására (Singh et al., 2015). Megfelelő dózisban a sugárzás károsítja a mikrobiális DNS-t. Fontos, hogy kisebb dózisoknál (≥ 4 kGy) a gamma-sugárzás csak minimálisan befolyásolja az élelmiszerek makro- és mikro tápanyagtartalmát, ízét és textúráját (Hing et al., 2022; Rafiepour et al., 2024). Nagyobb dózisok a lipidek degradációját okozhatják, nem kívánt szagokat és avas ízt eredményezve (Huang et al., 2023). Az élelmiszer besugárzás alkalmazható csomagolt termékek esetében is, ezzel megelőzve az utólagos szennyeződést (Pelicia et al., 2015). Ezek mellett az élelmiszer besugárzás lassítja az érés folyamatát, gátolja a csírázást és eliminálja a kártevőket (Yoon et al., 2023). Bár a WHO és az FAO biztonságosnak ismeri el, az elfogadás országonként változó. Tekintettel arra, hogy az ozmotikus stressz az aszalt gyümölcsökben elősegítheti a VBNC állapot kialakulását, alapvető fontosságú megérteni, hogyan befolyásolja a gamma-sugárzás az élelmiszerekben lévő mikroorganizmusokat a megfelelő élelmiszerbiztonság biztosítása érdekében (Web2).

Bár a friss gyümölcsök mikrobiótáját már széles körben vizsgálták, az aszalt gyümölcsök mikrobiótájáról kevesebb ismeret áll rendelkezésre. Számos tanulmány kimutatta, hogy a nem megfelelő higiéniai körülmények a teljes élelmiszerlánc során patogén baktériumokkal, (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Listeria* és *Staphylococcus*) történő szennyeződést eredményezhetnek, ami élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent. Az *Escherichia coli*-t választottam ebben a dolgozatban az aszalt gyümölcsök fekáliás szennyeződésének indikátoraként, valamint az ozmotikus stressz vizsgálatára szolgáló modellorganizmusként. A mikrobióta összetételének vizsgálata, illetve a cukor által kiváltott ozmotikus stressz *E. coli*-ra gyakorolt hatásának vizsgálata érdekében a következő célokat tűztem ki:

- A Magyarországon és Ausztriában kereskedelmi forgalomban kapható aszalt gyümölcsök (aszalt sárgabarack, aszalt szilva, mazsola) mikrobiális összetételének jellemzése, különös tekintettel az Enterobacteriaceae család tagjaira, kiemelten az *Escherichia coli*-ra,
- Szaporodási vizsgálatok elvégzése a Bioscreen rendszer segítségével annak megállapítására, hogy az *E. coli* képes-e szaporodni cukorban gazdag környezetben,
- Az aszalt gyümölcsökben található ozmotikus viszonyok vizsgálata arra vonatkozóan, hogy az *E. coli* képes-e VBNC-szerű állapotba kerülni,
- Az *E. coli* cukor által előidézett ozmotikus stresszhez való alkalmazkodásának szélesebb körű vizsgálata aszalt gyümölcsöket imitáló környezetben. Három célgén került kiválasztásra az ozmotikus stressz különböző aspektusainak reprezentálására: *osmC*, *talA* és *treA*,
- A gamma-sugárzás *E. coli*-ra gyakorolt hatásának vizsgálata ozmotikus stresszel kombinálva.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Aszalt gyümölcs minták beszerzése

Harminc kereskedelmi forgalomban kapható aszalt gyümölcs mintát (sárgabarack, aszalt szilva, mazsola) vásároltam magyar és osztrák boltokból és piacokról. Megpróbáltam lefedni a termékek széles skáláját (csomagolt/csomagolatlan, bio/nem bio, SO₂ kezelt/kezeletlen). A beszerzett mintákat szobahőmérsékleten tároltam. A munka a MATE–BOKU együttműködés (CEEPUS) és egy magyar–osztrák bilaterális projekt keretében valósult meg, ezért származnak a minták mindkét országból.

2.2. *Escherichia coli* törzsek megszerzése

Két *E. coli* törzset alkalmaztam a vizsgálataimhoz. Az egyiket a törzsgyűjteménytől kaptam (CC; ATCC B.02031) a másik pedig egy kis vízaktivitású élelmiszerből (hajdinaliszt) került izolálásra (FI). Az FI törzset egy tölem független kísérlet során izolálták, egy *Cronobacter* sp. szűrés keretében. A kísérlet során elődúsítást követően *Cronobacter* szelektív táptalajon szélesztették a mintát. Az azonosításhoz MALDI-TOF MS alkalmaztak, mely azonosította a mintából az *E. coli*-t. Hogy megbizonyosodjak arról, tényleg *E. coli*-t azonosítottak, tiszta tenyészetet készítettem, majd ezt MALDI-TOF MS-sel újra megvizsgáltam.

2.3. Szaporodási képesség meghatározása

A CC és FI törzsek azon képességét, képesek-e különböző ozmotikus viszonyok között szaporodni a Bioscreen C rendszerrel vizsgáltam. A törzseket LB táptalajban (kontroll), kis cukortartalmú közegben (0.35 M glükóz), valamint aszalt sárgabarack, aszalt szilva és mazsola cukortartalmát utánzó közegben vizsgáltam. A kísérletek alatt 24, 72 és 96 órán keresztül végeztem az inkubációt a különböző közegekben. Az egyik kísérletben ozmotikus környezetben előadaptált *E. coli* sejtek szaporodási képességét vizsgáltam aszalt szilvát utánzó közegben. A statisztikai elemzést Kruskal–Wallis és Wilcoxon tesztek alapján végeztem.

2.4. Az aszalt gyümölcsök mikrobiális diverzitásának vizsgálata tenyésztés függő módszerrel

Ebben a kísérletben két megközelítést alkalmaztam. Az első az aerob mezofil mikroorganizmusok kvalitatív kimutatása volt, különös figyelmet fordítva az Enterobacteriaceae család tagjaira, azon belül is az *E. coli*-ra. A mintákat homogenizálást követően elődúsítottam (MMGM, TSB), majd szelektív (TBX, VRBG) és nem szelektív (LB) táptalajokra szélesztettem. A második egy kvantitatív vizsgálat volt, hogy megállapíthassam az összcsíraszámot. Ennél a kísérletnél már nem alkalmaztam elődúsítást. A hígítást követően a mintákat Actidiont tartalmazó LB táptalajra szélesztettem. Az Actidion hozzáadása gátolta az élesztők és penészek szaporodását, így lehetővé téve az összcsíraszám meghatározását.

A lemezekről származó baktérium és penész/élesztő izolátumokat MALDI-TOF MS-sel azonosítottam. Minden lemezről szemrevételezést követően eltérő telepeket választottam, végül a mintákat standard hangyasav-kivonási eljárás szerint készítettem elő, és a Bruker könyvtárak alapján azonosítottam.

2.5. Kiegészítő vizsgálatok a mikrobióta jellemzésére

Az aszalt gyümölcsök mikrobiótájának jobb megismerése érdekében a gyümölcsök pH-ját, vízaktivitását és a cukortartalmát is elemeztem.

2.6. 16S rDNS amplicon szekvenálás (tenyésztés független analízis)

Kiegészítéseként a tenyésztés függő azonosítás mellé, a mikrobióta összetételét 16S rDNS amplicon szekvenálással is meghatároztam. Első lépésként DNS kivonást végeztem a DNeasy PowerFood Microbial Kit segítségével. A ~1,500 bp hosszú 16S gént az Oxford Nanopore 16S Barcoding Kit és AccuStart II PCR SuperMix segítségével amplifikáltam, a gyártó leírását követve. Az amplicon méretét 2 %-os agaróz gélen, GelRed festékkel ellenőriztem. A DNS mennyiségét Qubit fluorométerrel validáltam. A barcode-olt mintákat a Rapid Sequencing DNA - 16S barcoding kit 24 V14 segítségével készítettem a gyártó protokollja szerint, majd a szekvenálást MinION készülékkel végeztem.

2.7. Stressz indukálása ionizáló sugárzással

2.7.1. Az elektrongyorsító és gamma-sugárzás összehasonlítása

Előzetes vizsgálatokat végeztem annak érdekében, hogy összehasonlíthassam az elektrongyorsító és a gamma sugárzás hatását a törzsgyűjteményből származó *E. coli*-ra. Friss tenyészetet készítettem az *E. coli*-val LB táplevesben, majd a tenyészet 600 nanométeren mért optikai denzitás (OD₆₀₀) értékét friss LB táptalajjal 0,1-re állítottam be. A minták besugárzására a Wigner Fizikai Kutatóközpontban került sor 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 és 1 kGy dózissal. A besugárzást követően a mintákat hígítottam, majd LB agaron szélesztettem és 37 °C-on 24 órán keresztül inkubáltam.

2.7.2. A törzsgyűjteményből származó E. coli törzs D-értékének meghatározása elektrongyorsítóval végzett sugárzás esetén

Az előző összehasonlító kísérlet eredményei alapján az *E. coli* D-értékét 0,5; 1; 1,5 és 2 kGy dózissal határoztam meg, melyhez az elektrongyorsító volt a sugárforrás. A besugárzást követően a mintákat hígítottam, majd LB agaron szélesztettem és 37 °C-on 24 órán keresztül inkubáltam

2.7.3. Az E. coli viselkedésének vizsgálata aszalt gyümölcsöket utánzó ozmotikus közegben gamma-sugárzás hatására

A kísérlet során az *E. coli* túlélést glükózt, fruktózt vagy szacharózt különböző koncentrációban (10 %, 30 % és 50%) tartalmazó közegben vizsgáltam. A tenyészet OD₆₀₀ -as értékét 0,1-re állítottam a cukrot tartalmazó táplevesekben, majd 1; 1,5; 1,8; 2; 2,5 kGy gamma-sugárzásnak vettem alá a mintákat. A besugárzást követően a mintákat hígítottam, majd LB agaron szélesztettem és 37 °C-on 24 órán keresztül inkubáltam.

2.7.4. A törzsgyűjteményből és a kis vízakaktivitású közegből származó E. coli törzsek D-értékének meghatározása gamma-sugárzással

A sugárdózisokat 1,3; 1,6; 1,9; 2,2; 2,5 kGy-re módosítottam, a vizsgálatot pedig mindkét *E. coli* törzssel (CC, FI) elvégeztem. A sugárzást LB táplevesben, illetve aszalt szilvát imitáló közegben végeztem. A besugárzást követően a mintákat hígítottam, majd LB agaron szélesztettem és 37 °C-on 24 órán keresztül inkubáltam.

2.7. Primerek tervezése kvantitatív PCR (qPCR) vizsgálatokhoz

A kísérleteimhez kiválasztott génekhez (*rpoB*, *osmC*, *treA* és *talA*) a primereket a Primer3web segítségével terveztem. A másodlagos szerkezet képződését OligoAnalyzer-rel értékeltem, a specificitást pedig NCBI BLAST-tal ellenőriztem. Annak érdekében, hogy meghatározzam az optimális annealási hőmérséklet gradiense PCR-t (55–61 °C) végeztem. A reakciókhoz AccuStart II PCR SuperMix-et használtam, az eredményt pedig agaróz gél elektroforézissel elemeztem.

2.8. Élő, de nem tenyésztető (VBNC)-szerű sejtek kimutatása

Az volt a cél, hogy meghatározzam, hogy az *E. coli* sejtek különböző ideig tartó ozmotikus stresszalatt VBNC-szerű állapotba kerülnek-e. Az ozmotikus stressz kísérletek két részből álltak, melyeket alább mutatok be.

2.9.1. Ozmotikus stressz indukálása előzetes adaptáció nélkül (életképesség és tenyésztetőség vizsgálat)

Az OD₆₀₀ értékét a különböző aszalt gyümölcsöt imitáló tápleveseknek (aszalt sárgabarack, aszalt szilva, mazsola) 0,1-re állítottam a friss *E. coli* törzsekkel (CC, FI) LB, majd 1, 2, 3, 4, 5, 24 és 96 órán keresztül inkubáltam a mintákat. Ez az inkubáció jelentette a stressz periódust. Az LB tápleves kontrollként szolgált. Az adott stressz intervallum lejártát követően a minták egy részét szélesztettem a tenyésztetőség vizsgálatához, másik részét pedig lefagyasztottam későbbi DNS-kivonáshoz és életképesség vizsgálatokhoz (qPCR).

2.9.2. Ozmotikus stressz indukálása előzetes adaptációval

A előadaptáció hatásának vizsgálatára a törzsgyűjteményből származó *E. coli* törzset 2,5 órán keresztül inkubáltam LB táplevesben és kis cukortartalmú közegben (0,35 M glükóz). A kontroll mintákat az előadaptáció követően szélesztettem. Ezután a sejteket aszalt gyümölcsöket (aszalt sárgabarack, aszalt szilva, mazsola) imitáló táplevesben inkubáltam 4 és 24 órán keresztül. Ez az inkubáció jelentette a stressz periódust. Az adott stressz intervallum lejártát követően a minták egy részét szélesztettem a tenyésztetőség vizsgálatához, másik részét pedig lefagyasztottam későbbi DNS-kivonáshoz és életképesség vizsgálatokhoz (qPCR).

2.9.3. DNS-kivonás a stresszelt sejtekből és propidium-monoazid (PMA)-qPCR

A DNS-kivonást a peqGOLD Bacterial DNA Kit-tel végeztem annak leírása szerint. A DNS kivonás előtt a mintákhoz propidium monoazidot adtam, mely lehetővé tette, hogy csak az élő sejtekből származó DNS kerüljön amplifikációra a PCR során. Ezután a mintákat lizozimmal, proteináz K-val és RNáz-zal kezeltem. A PCR-hez SYBR Green-t használtam. A PCR ciklus magában foglalta az elődenaturációt 95 °C-on 60 másodpercig, melyet 40 ciklusnyi denaturáció 95 °C-on 15 másodpercig, annellálás 57 °C-on 30 másodpercig és lánchosszabbítás 72 °C-on 30 másodpercig követett. A fluoreszcencia detektálására a lánchosszabbítás végén került sor. A standard görbét az *E. coli* DNS-ének tízszeres hígításából készítettem. A tenyésztetőséget (lemezöntés) három párhuzamosban, az életképességet (qPCR) két párhuzamosban vizsgáltam. A statisztikai elemzéseket Wilcoxon/Kruskal-Wallis tesztekkel végeztem.

2.9. Génexpressziós vizsgálat

A génexpresszió vizsgálatára az aszalt szilvát imitáló közeget választottam az előző kutatásaim eredményei alapján.

2.10.1. Ozmotikus stressz indukálása

Az *E. coli* két törzsét (CC, FI) a logaritmikus szaporodási fázis közepéig szaporítottam, majd centrifugálást követően LB-ben és aszalt szilvát imitáló táplevesben szuszpendáltam újra. A sejteket 0,5; 1; 3 és 16 órán keresztül inkubáltam. Ez az inkubáció jelentette a stressz periódust. A sejteket centrifugálást követően, RNA Protect oldatban stabilizáltam és 4 °C-on tároltam a génexpressziós vizsgálatokig.

2.10.2. Génexpresszió elemzése

Az RNS-t RNeasy Mini Kit segítségével izoláltam a kitéhez tartozó leírás alapján. A tisztított RNS-t RNáz-mentes vízben eluáltam. A komplementer DNS (cDNS) szintéziséhez a QuantiTect Reverse Transcription Kit-et használtam a kit leírása alapján. A génexpressziós qPCR vizsgálatokhoz SYBR Green-t használtam. A PCR program magában foglalta az 95 °C-os 10 perces elődenaturációt, majd 40 ciklusnyi denaturáció 95°C-on 15 másodpercig, annealálás 57 °C-on 30 másodpercig, és lánchosszabbítás 72°C-on 30 másodpercig követett. A negatív kontrollokban a templát DNS-t PCR-minőségű vízzel helyettesítették. A fluoreszcencia detektálására a lánchosszabbítás végén került sor. A relatív génexpressziót $\Delta\Delta Ct$ módszerrel számoltam ki, melyhez az *rpoB* háztartási gént referenciaként használtam, a génexpresszió változását pedig a következő képlettel határoztam meg: génexpresszió változás = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3. EREDMÉNYEK

3.1 A szaporodási képesség meghatározása

Az *E. coli* szaporodási képességére irányuló kísérleteim azt mutatták, hogy mindkét törzs (CC, FI) jól szaporodott LB-ben és kis cukortartalmú táplevesben, azonban a különböző aszalt gyümölcsöket imitáló táplevesek közül csak az aszalt szilvát imitáló tápleves támogatta a baktériumok szaporodását. Ebben a közegben a törzsek optikai denzitása (OD) idővel fokozatosan növekedett, bár a lag fázis meghosszabbodott. Ez 32 óráig tartott az FI törzs, és 85 óráig a CC törzs esetében, abban az esetben, amikor az LB-ben előadaptált sejtek az aszalt szilvát imitáló táplevesbe kerültek. Ezzel szemben, azok a sejtek, melyek az aszalt szilvát imitáló táplevesben előadaptálódtak, majd LB táplevesbe kerültek, jóval rövidebb lag fázist mutattak (~3 óra az FI és ~6 óra a CC törzs esetében). Ez kiemeli az előadaptáció és a közeg hatását a szaporodási dinamikára. Az LB-ben vagy az aszalt szilvát imitáló közegben végzett előadaptáció befolyásolta a szaporodási dinamikát. Az aszalt szilvát imitáló közegben megfigyelhető volt a bakteriális szaporodás még azután is, hogy a törzsek 192 órán keresztül előadaptálódtak. Összességében a szilvát imitáló tápleves következetesen támogatta az *E. coli* szaporodását, ami összhangban áll korábbi kutatásokkal, amelyek szerint az élelmiszer-eredetű patogének túlélnek az aszalt gyümölcsökön.

3.2 Az aszalt gyümölcsök mikrobiális diverzitásának vizsgálata tenyésztés függő módszerrel

A baktériumfajok azonosításához MALDI-TOF MS-t alkalmazva 20 baktérium nemzetséget azonosítottam a 30 aszalt gyümölcs mintából. A leggyakrabban előforduló baktérium nemzetségek csökkenő sorrendben a következők voltak: *Bacillus*, *Priestia*, *Peribacillus*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Cytobacillus*, *Lysinibacillus* és *Niallia*. Tíz nemzetség mindössze egy-egy mintában fordult elő. A vizsgált aszalt gyümölcsök közül a mazsolák mikrobiotája bizonyult a legváltozatosabbnak, ezt követték az aszalt sárgabarackok, míg az aszalt szilvákban figyelhető meg a legkisebb mikrobiális sokszínűség. Ennek oka valószínűleg az aszalt szilvák nagyobb fenolos és antioxidáns-tartalma, amely gátolja a baktériumok szaporodását. Számos azonosított faj (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium*, *Lysinibacillus* és *Metabacillus*) tipikusan környezeti kontamináns, azaz izolálásuk általában talajhoz vagy növényekhez köthető, ami a betakarítás vagy feldolgozás közbeni szennyeződésre utal. Emellett több potenciálisan opportunista patogént is azonosítottam, mint például *Staphylococcus epidermidis*-t, *Pantoea agglomerans*-t, *Pseudomonas* sp.-t, *Enterococcus* sp.-t, *Mixta calida*-t és *Priestia flexa*-t, amelyek az utólagos szennyeződést és a nem megfelelő higiéniai gyakorlatot jelzik. Jelenlétük az aszalt gyümölcsökben romlási és élelmiszerbiztonsági szempontból egyaránt jelentős. A penészes szennyeződés szintén kiemelkedő volt. Ez nem meglepő, hiszen az élesztők és penészek jobban tolerálják az ozmotikus stresszt. Mindezek ellenére a penészek és élesztők azonosítása csak az aszalt sárgabarackok 27 %-ában, az aszalt szilvaminták 25 %-ában, míg a mazsola minták 72%-ában volt lehetséges. Az aszalt gyümölcsök élesztő- és penészvizsgálata minden mintatípusban elsősorban ozmotoleráns élesztők (főleg *Zygosaccharomyces* fajok) gyakori jelenlétét mutatta. A penészek közül a legtöbb fajt a mazsolákból sikerült kimutatnom, összesen 11 különböző penészfajt. Összességében elmondható, hogy az aszalt gyümölcsök könnyen szennyeződhetnek baktériumokkal, mivel gyakran nyitott tárolókban árusítják őket, és a fogyasztás előtt általában nem esnek át további feldolgozási lépéseken, például mosáson vagy hőkezelésen.

3.3 Kiegészítő vizsgálatok a mikrobióta jellemzéséhez

Az aszalt gyümölcsök pH-értéke gyümölcstípusonként eltérő volt: az aszalt sárgabarackok átlagos pH-ja 4,21, az aszalt szilváké 3,84, míg a mazsoláké 3,83 volt. Az aszalt sárgabarackok pH-ja szignifikánsan eltért az aszalt szilva ($Z = 2,0889$, $p = 0,0367$, $\alpha = 0,05$) és a mazsola ($Z = -3,81$, $p = 0,0001$, $\alpha = 0,05$) minták pH értékétől. Gyümölcstípuson belül az egyes minták között jelentős pH különbségek mutatkoztak meg, amelyek befolyásolták a mikrobiális szennyezettséget és sokszínűséget. A nagyobb pH-jú mintákban általában több baktérium- és penész fordult elő, míg a kisebb pH-jú minták csökkent mikrobiális diverzitást figyeltem meg.

A vízaktivitás (a_w) értékek szintén eltérőek voltak a gyümölcstípusok között. Az aszalt sárgabarackok átlagos a_w -értéke 0,64, az aszalt szilváké 0,74, míg a mazsoláké 0,45 volt. Egyes kis a_w -értékű mintákban ennek ellenére is több baktérium- és penészfaj volt kimutatható, míg bizonyos nagyobb a_w -értékű minták kisebb mikrobiális sokszínűség volt megfigyelhető. Ez arra utal, hogy más tényezők, például a pH, a gyümölcs feldolgozása, a csomagolás vagy a gyümölcsben lévő antimikrobiális vegyületek jelenléte szintén befolyásolják a mikroorganizmusok túlélését az aszalványokban. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi vizsgálatokkal, amelyek szerint a baktériumok savas és kis vízaktivitású élelmiszerekben is túlélhetnek, viszont túlélésük számos elő- és utóbetakarítási tényezőtől függ.

A cukorkoncentrációk az aszalt sárgabarack-, aszalt szilva- és mazsola minták között is eltérést mutattak, és általában kisebbek is voltak a szakirodalomban közölt értékeknél. Ennek oka valószínűleg a kísérletet megelőző hosszabb tárolási idő. A 30 minta közül csupán hét mintán szerepelt tartósítószerre vonatkozó jelölés, más esetekben ez az információ nem állt rendelkezésre. A tartósítószer-tartalom mérése analitikai módszerekkel ebben a dolgozatban nem történt meg, ezért a tartósítószer mikrobiótára gyakorolt hatására vonatkozó következtetések e korláttal együtt értelmezendők. A tartósítószerrel kezelt minták mikrobiótája eltért, de ezek a termékek nem minden esetben mutattak csökkent mikrobiális sokszínűséget. Összességében az adatok arra utalnak, hogy a kén-dioxid bizonyos esetekben valóban gátolja a mikrobák szaporodását. Ugyanakkor a felhasznált tartósítószer típusa, a tárolási körülmények és a feldolgozás módja egyaránt jelentősen befolyásolja az aszalt gyümölcsök mikrobióta-összetételét.

3.4 A 16S rDNS amplikon szekvenálás (tenyésztés független elemzés)

A kereskedelmi forgalomból származó 30 aszalt gyümölcsminta közül összesen hét baktériumnemzetséget (*Bacillus*, *Priestia*, *Pantoea*, *Neobacillus*, *Tumebacillus*, *Cytobacillus*, *Mesobacillus*) azonosítottam tenyésztéstől független módszerrel, melyhez a 16S rDNS amplikon szekvenálás alkalmaztam. A leggyakrabban kimutatott nemzetség a *Bacillus* volt, amely megegyezik a tenyésztés függő módszer eredményeivel. A tenyésztés független módszerrel kimutatott valamennyi további nemzetség megjelent a tenyésztés függő vizsgálatok során is, kivéve a *Neobacillus*, *Mesobacillus* és *Tumebacillus* nemzetségeket. A *Neobacillus* két aszalt sárgabarack mintából (7-es, 10-es minta) került kimutatásra. A *Tumebacillus* egy aszalt sárgabarackból (10-es minta) és egy mazsola mintából (23-as minta) volt azonosítható, míg a *Mesobacillus*-t egy aszalt sárgabarack mintából (10-es minta) izoláltam. A minták eltérő környezetből származtak: a 7-es minta előre csomagolt termék volt, ezzel szemben a 10-es mintát egy szabadtéri piacon vásároltam, ahol a gyümölcsöket részben nyitott tárolóedényben tartották, melyek csak az eladó számára voltak hozzáférhetők. A 23-as minta szintén piacról származott, ahol a gyümölcsöket nyitott tárolóban tartották. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy e nemzetségek egyes tagjai képesek tolerálni az kis vízaktivitást és a nagy hőmérsékletet, melyek olyan körülmények, amelyek az aszalási folyamat során is jelen vannak. Mivel ezen

nemzetségekben folyamatosan növekszik az újonnan leírt fajok száma, egyre fontosabbá válik a megfelelő higiéniai gyakorlatok és az utókezelési lépések betartása, különösen annak fényében, hogy a jövőben potenciálisan patogén törzsek is kialakulhatnak.

3.5 Besugárzás

Ebben a fejezetben a sugárkezelési kísérletek eredményei kerülnek bemutatásra, amelyek célja az volt, hogy felmérjem a különböző közegekben alkalmazott sugárzás hatását az *E. coli* törzsekre.

3.5.1 Az elektronyorsító és gamma-sugárzás összehasonlítása

Ebben a kísérletben két sugárforrás, az elektronyorsító és a gamma-sugárzás összehasonlítására került sor annak érdekében, hogy a további kísérletekhez megtaláljam a legalkalmasabb módszert. Az *E. coli* D-értéke az elektronyorsítóval történő besugárzás esetén 0,20 kGy, a gamma-sugárzás esetén pedig 0,21 kGy volt. Mivel mindkét eljárás szinte azonos inaktiválási hatékonyságot mutatott, a későbbi kísérletek elvégzéséhez az elektronyorsítót választottam. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy mindkét sugárkezelési mód az *E. coli* sejtszám 1 logaritmusnyi csökkenést eredményez az alkalmazott körülmények között.

3.5.2 A törzsgyűjteményből származó E. coli törzs D-értékének meghatározása elektronyorsítóval végzett sugárzás esetén

A törzsgyűjteményből származó *E. coli* törzs elektronyorsítóval történő besugárzása LB táptalajban 0,24 kGy D-értéket eredményezett. A növekvő dózisok a túlélő sejtek számának csökkenéséhez vezettek, és 2 kGy dózisonál a baktériumpopuláció körülbelül 8 nagyságrenddel csökkent. Ez azt jelzi, hogy az elektronyorsítóval végzett kezelés rendkívül hatékony az *E. coli* inaktiválásában ezen körülmények között.

3.5.3 Az E. coli viselkedésének vizsgálata aszalt gyümölcsöket utánzó ozmotikus közegben gamma-sugárzás hatására

A gamma-sugárzással végzett kísérletek kimutatták, hogy a törzsgyűjteményből származó *E. coli* törzs D-értéke megnőtt nagy cukorkoncentrációjú közegekben (glükóz, fruktóz, szacharóz). A glükóz biztosította a legerősebb védőhatást, különösen 50 %-os koncentrációban, míg a fruktóz és a szacharóz mérsékelt védelmet nyújtott nagyobb koncentrációk mellett. A kis cukorkoncentráció (10 %) csak minimális befolyást gyakorolt az *E. coli* D-értékére. Az eredményeim azt mutatják, hogy a nagy cukortartalmú közegek (aszalt gyümölcsök) fokozott védelmet biztosíthatnak ionizáló sugárzással szemben. Ez kiemeli a vegyes cukortartalmú élelmiszermatrixok vizsgálatának fontosságát a mikrobiológiai kockázatbecslés esetén.

3.5.4 A törzsgyűjteményből és a kis vízakaktivitású élelmiszerből származó E. coli törzsek D-értékének meghatározása gamma-sugárzással

Mind a törzsgyűjteményből, mind a kis vízakaktivitású élelmiszerből származó *E. coli* törzs azonos, 0,31 kGy-es D-értéket mutatott LB táplevesben (kontroll) gamma-besugárzás esetén. A szilvát imitáló táplevesben a D-értékek kissé megemelkedtek (0,34, illetve 0,36 kGy), ami mérsékelt védőhatásra utal a gamma-sugárzással szemben. Bár ez a védelem nem volt jelentős mértékű, az eredmények megerősítik, hogy az élelmiszermatrix összetétele befolyásolja a baktériumok sugárzással szembeni toleranciáját.

3.6 Ozmotikus stressz modellezése

Az ozmotikus stresszel kapcsolatos vizsgálatokat azért végeztem, hogy a nagy cukorkoncentrációjú, kis vízakaktivitású közegek, amelyek a különböző aszalt gyümölcsök (aszalt

sárgabarack, aszalt szilva, mazsola) környezetéhez hasonlóak, hogyan befolyásolják az *E. coli* életképességét és tenyésztetőségét. A kísérleteimben azt is vizsgáltam, hogy a mérsékelt ozmotikus körülményekhez történő előzetes alkalmazkodás módosítja-e a baktériumok túlélését a későbbi ozmotikus stressz során.

3.6.1 Ozmotikus stressz előzetes adaptáció nélkül (életképesség és tenyésztetőség vizsgálata)

Az aszalt gyümölcsöket imitáló tápközegekben végzett kísérletek azt mutatták, hogy mindkét *E. coli* törzs (törzsgyűjteményből származó, kis vízaktivitású élelmiszerből izolált) megőrizte életképességét, de elvesztette tenyésztetőségét, ami arra utal, hogy ozmotikus stressz hatására egy életképes, de nem tenyésztető (VBNC-szerű) állapotba kerülhetnek. Míg a kontrollban (LB-tápleves) stabil sejtszám volt megfigyelhető, mindkét *E. coli* törzs tenyésztetősége 24–96 órán belül lecsökkent a gyümölcsöt utánzó közegekben. A hosszabb ideig előadaptált sejtek azonban képesek voltak visszanyerni szaporodási képességüket tápanyagban gazdag (LB) közegbe történő átvitel után, ami arra utal, hogy a tenyésztetőség látszólagos elvesztése inkább elnyújtott lag fázist vagy metabolikus nyugalmi állapotot jelezhet, és nem feltétlenül valódi VBNC állapotot. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az *E. coli* hagyományos tenyésztésen alapuló módszerekkel kimutathatatlanul válhat az aszalt gyümölcsökben, de tápanyagban gazdag élelmiszerekben, melyek esetében nem alkalmazunk további feldolgozási lépéseket, visszanyerhetik vegetatív formájukat. Ilyen élelmiszer például az azonnal fogyasztható zabkása (overnight oats) aszalt gyümölcsökkel, amelyet véletlenül szobahőmérsékleten tárolnak hűtés helyett. A szakirodalom hasonló jelenséget ír le a *Salmonella* esetében is, amely VBNC állapotba került aszalt gyümölcsökön, noha tenyésztési módszerekkel nem volt feléleszthető (Jayeola et al., 2022). A kórokozók VBNC állapota jelentős kihívást jelent az élelmiszerbiztonsági monitorozás és kockázatbecslés számára.

3.6.2 Ozmotikus stressz indukálása előzetes adaptációval

Az *E. coli* kis cukorkoncentrációjú (0,35 M glükóz) környezethez történő előzetes adaptációja befolyásolta a későbbi ozmotikus stresszre adott válaszát az aszalt gyümölcsöket imitáló táplevesekben. Az eredmények azt mutatták, hogy az előadaptált sejtek túlélése javult, a közeg típusától és a stresszhatás időtartamától függően. Az kis cukorkoncentrációhoz adaptálódott sejtek esetében szignifikánsan nagyobb sejtszám volt megfigyelhető az aszalt szilvát imitáló táplevesben 4 óra után ($Z = 2,5067$, $p = 0,0122$, $\alpha = 0,05$), és a mazsolát imitáló táplevesben 24 óra után ($Z = 2,0889$, $p = 0,0367$, $\alpha = 0,05$), míg az aszalt sárgabarackot imitáló táplevesben mindkét időpontban következetesen, de nem szignifikánsan nagyobb sejtszám volt megfigyelhető. Az eredmények arra utalnak, hogy már egy rövid ideig tartó, mérsékelt ozmotikus környezethez történő adaptáció is fokozhatja az *E. coli* perzisztenciáját a későbbi, egyébként már gátló cukorkoncentrációk mellett. Tekintettel az aszalt gyümölcsök széles körű fogyasztására és az *E. coli* túlélési képességére a nagy cukortartalmú élelmiszer-mátrixokban, az ozmotikus előadaptációt figyelembe kell venni a mikrobiológiai kockázatok értékelésekor, mivel ez növelheti a kórokozók fennmaradásának esélyét a hőkezelés vagy más mikrobaszám-csökkentő lépések nélkül fogyasztott élelmiszerekben.

3.7 Génexpressziós vizsgálat

Mindkét *E. coli* törzs (CC, FI) esetében fokozott *osmC* és *talA* génexpresszió volt megfigyelhető az első 30 percben, ami viszont 1 óránál már le is csökkent. Ezt követően az expressziós szintek stabilizálódtak. A harmadik vizsgált gén, a *treA*, csak mérsékelt, átmeneti növekedést mutatott 30 percnél. A mért génexpressziós szintek következetesen kisebbek voltak az FI törzsből, ami arra utal, hogy az élelmiszer-eredetű izolátum jobban alkalmazkodott a nagy ozmotikus nyomású

környezetekhez. A 30 percnél megfigyelt expressziós csúcs a stresszválasz mechanizmusok gyors aktiválásával magyarázható, amelyek stabilizálják az *E. coli* sejthomeosztázisát a cukorban gazdag közegekbe történő átkerülést követően, miközben a hosszú távú adaptációs folyamatok elindulnak. Ahogy a sejtek alkalmazkodnak az ozmotikus körülményekhez, ezen gének expressziója csökken. Alternatív magyarázatként az is lehetséges, hogy a baktériumok hosszú távú túlélésükhöz elsődlegesen nem ezekre a génekre támaszkodnak.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A tenyésztés függő módszerrel, amelyben MALDI-TOF MS-t használtam a telepek azonosítására, összesen 20 különböző baktériumnemzetséget sikerült kimutatnom a 30 aszalt gyümölcsmintából. A három leggyakrabban előforduló nemzetség a *Bacillus* (21 mintában), a *Priestia* (12 mintában) és a *Peribacillus* (10 mintában) volt. A legtöbb izolátum általában környezeti mintákból (föld, víz, növények felülete) kerül izolálásra, mint például a *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pseudomycooides*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis*, *B. velezensis* és *Curtobacterium flaccumfaciens*. Ugyanakkor potenciálisan patogén fajokat is azonosítottam, többek között *Staphylococcus epidermidis*-t, *Pantoea agglomerans*-t, *Enterococcus mundtii*-t, *Micrococcus luteus*-t, *Mixta calida*-t és *Priestia flexa*-t. A *Pantoea* és az *Enterococcus* nemzetség egyes tagjai ezzel szemben kedvező szerepet is betölthetnek az élelmiszerekben vagy az ökológiai környezetben, ugyanis elősegíthetik a növények növekedésének, antimikrobiális vegyületek termelhetnek, vagy részt vehetnek a fermentációs folyamatokban. Ezek arra utalnak, hogy egyaránt viselkedhetnek opportunista kórokozóként és hasznos mikroorganizmusként. A tenyésztéstől független 16S rDNS amplikon szekvenálás 29 mintában mutatta ki a *Bacillus* nemzetség jelenlétét, ami szélesebb lefedettséget jelez a tenyésztés függő módszerhez képest. Emellett még kimutattam olyan környezeti kontaminánsokat is (*Mesobacillus*, *Neobacillus*, *Tumebacillus*), amelyeket MALDI-TOF MS-sel nem lehetett azonosítani. Ez arra utalhat, hogy az aszalt gyümölcs minták potenciálisan VBNC sejteket is tartalmaztak. Az *E. coli* egyik módszerrel sem volt kimutatható. Korábbi tanulmányokból azonban ismert, hogy az *E. coli* képes túlélni kis vízakivitású élelmiszerekben, illetve már több járvány is köthető az ilyen termékekhez (Ntuli et al., 2017; Abed, 2025). Amennyiben sikerül kimutatnom az *E. coli*-t, az lehetővé tette volna a minták mikrobiológiai biztonságának mélyebb értékelését és a lehetséges utófeldolgozási kontaminációs útvonalak feltárását. Bár a baktérium nem volt detektálható, esetleges jelenléte a VBNC állapotban vagy akár kimutatási határ alatti mennyiségben nem zárható ki, hiszen a nagy előfordulási arányban lévő fajok akár el is fedhették a jelenlétét, különösen akkor, ha DNS-e nagyon kis mennyiségben volt csak jelen. Összességében a tenyésztés függő módszer nagyobb bakteriális diverzitást tárt fel, míg a tenyésztéstől független módszer kiegészítő információkat szolgáltatott. Az eredmények hangsúlyozzák, hogy a mikrobiális diverzitás teljes körű feltárásához mindkét módszer együttes alkalmazása szükséges. A penészek és élesztők jelenlétét csak a tenyésztés függő módszerrel vizsgáltam. Ezzel két élesztő fajt (*Zygosaccharomyces rouxii* és *Z. bailii*) és 13 penészgomba fajt mutattam ki, mely összesen 9 nemzetségbe (*Arthrimum*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Neoscytalidium*, *Scopulariopsis*, *Microsporium*, *Cladosporium*, *Penicillium* és *Rhizopus*) tartozott. A patogén penészek (*Aspergillus niger* és *Arthrimum phaeospermum*) jelenléte aggodalomra ad okot, mivel az *A. niger* mikotoxinokat termel, és mindkét faj opportunista emberi megbetegedésekkel is összefüggésbe hozható. Ugyanakkor az *A. niger* széles körben használatos ipari környezetben enzimek előállítására. Fontos megjegyezni, hogy az aszalt gyümölcsökben a gombás szennyeződés gyakran nagyobb kockázatot jelent, mint a bakteriális szennyezettség, mivel számos penész képes mikotoxinokat termelni, amelyek a feldolgozás és tárolás során is stabilak maradnak.

Az *E. coli* ozmotikus stressz alatti viselkedésének vizsgálatához eltérő cukortartalmú, aszalt gyümölcsöket utánzó (aszalt sárgabarack, aszalt szilva, mazsola) tápleveseket állítottam elő. Az első cél annak meghatározása volt, hogy az *E. coli* képes-e túlélni ilyen ozmotikus körülmények között. Ez az *E. coli* szaporodási képességeire irányuló vizsgálat kimutatta, hogy az képes szaporodni az aszalt szilvát imitáló közegben 37 °C-on. A lag fázis azonban megnyúlt, és

körülbelül 32 óráig tartott az FI törzs, illetve 85 óráig a CC törzs esetében, abban az esetben, amikor az LB-ben előadaptált sejtek aszalt szilvát imitáló közegbe kerültek. Továbbá egy másik kísérletet is végeztem, amely azt szimulálta, hogy az *E. coli* kedvezőtlen környezetből kedvező környezetbe kerülve képes-e visszanyerni szaporodási képességét. Azoknál a sejteknél, amelyek aszalt szilvát imitáló közegben adaptálódtak, majd tápanyagdús LB közegbe kerültek, sokkal rövidebb lag fázis (~3 óra az FI és ~6 óra a CC törzs esetében) volt megfigyelhető, illetve az *E. coli* visszanyerte szaporodási képességét. Hétköznapi példával élve, hasonló helyzet állhat elő akkor, amikor az aszalt gyümölcsben jelen lévő *E. coli* joghurtba vagy tejjel/vízzel készített zabkásába kerül.

A korábban leírt cukros tápleveseket alkalmaztam annak értékelésére, hogy az *E. coli* ozmotikus stressz hatására potenciálisan VBNC-szerű állapotba kerülhet-e. A 96 órás stresszt követően a hagyományos módon vizsgált tenyésztetőség jelentősen csökkent míg a PMA-qPCR-rel mért életképesség változatlan maradt, ami potenciális VBNC-szerű viselkedésre utal. Ugyanakkor a tényleges életképesség megerősítésére és a reszuszcitációs képesség vizsgálatára nem végeztem kísérleteket a munkám során, így a VBNC-szerű sejtek jelenlétére még csak következtetni lehet. Továbbá, az aszalt szilvát imitáló közegben 192 órán át előadaptált sejtek visszanyerték szaporodási képességüket LB táplevesbe történő átvitel után, ami esetlegesen egy hosszabb lag fázist jelezhet a valódi VBNC állapot helyett.

Az ozmotikus környezethez történő előadaptáció hatását is vizsgáltam annak érdekében, hogy megfigyeljem, ez hogyan befolyásolja az *E. coli* viselkedését nagy cukortartalmú közegekben. A mérsékelt ozmotikus stressznek (0,35 M glükóz) 2,5 órán át kitett *E. coli* sejtek szignifikánsan nagyobb sejtszámot mutattak az aszalt szilvát imitáló közegben 4 óra stressz után a nem adaptált sejtekhez képest ($Z = 2,5067$, $p = 0,0122$, $\alpha = 0,05$). Ez a különbség azonban 24 óra elteltével már nem volt szignifikáns. A mazsolát imitáló közegben 24 óra stressz után az előadaptált sejtek szignifikánsan magasabb sejtszámot mutattak a nem adaptált sejtekhez képest ($Z = 2,0889$, $p = 0,0367$, $\alpha = 0,05$). Az aszalt sárgabarackot imitáló közegben mind a 4, mind a 24 órás időpontban nagyobb sejtszámot mértem az előadaptált sejtek esetében, azonban ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak. Az aszalt sárgabarackot imitáló közegben mind a 4, mind a 24 órás időpontban nagyobb sejtszámot mértem a nem előadaptált sejtszámhoz képest, de ez nem volt szignifikáns. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy már rövid előadaptáció is javíthatja az *E. coli* túlélőképességét nagy cukorkoncentrációjú környezetben. Tekintettel az aszalt gyümölcsök széleskörű fogyasztására és az *E. coli* szaporodási képességére nagy cukortartalmú közegekben, az ozmotikus előadaptációt érdemes figyelembe venni a mikrobiológiai kockázatok értékelésekor, mivel növelheti a kórokozók fennmaradásának esélyét az élelmiszerekben.

A génexpressziós vizsgálatok az aszalt szilvát imitáló táplevesben gyors transzkripciós válaszokat mutattak ozmotikus stresszre. Mindhárom vizsgált gén (*osmC*, *talA*, *treA*) expressziója megnőtt 30 percen belül. A törzsgyűjteményből származó törzs és a kis vízakivitású élelmiszerből származó izolátum összehasonlítása azt mutatta, hogy az élelmiszer-eredetű törzs jobban tolerálta az ozmotikus stresszt. A 30 percnél mért expressziós csúcs valószínűleg az *E. coli* gyors stresszválasz-mechanizmusainak aktiválódását jelzi, amelyek segítik a sejt homeosztázisának stabilizálását. Ahogy a sejtek alkalmazkodnak, a génexpresszió visszaesik. Viszont az is lehetséges, hogy az *E. coli* a hosszú távú túléléshez elsősorban nem ezekre a génekre támaszkodik.

A gamma-sugárzás hatékonyságát különböző koncentrációjú glükózt, fruktózt és szacharózt tartalmazó táplevesekben, valamint aszalt szilvát imitáló táplevesben határoztam meg. A két

E. coli törzs (CC, FI) vizsgálata azt mutatta, hogy a nagy cukorkoncentráció növeli az *E. coli* D-értékét gamma sugárzással szemben, ami védőhatásra utal. Ennek fontos következményei vannak az aszalt gyümölcsök és más nagy cukortartalmú termékek hatékony kezelési stratégiáinak kialakításában.

A fentiek alapján az alábbi javaslatokat teszem a jövőbeli kutatások számára:

- A mikrobióta jellemzésének elvégzése nagyobb mintaszámmal,
- A mintaelőkészítési protokollok optimalizálása a tenyésztés függő- és független módszerekhez,
- A penészek azonosítására általánosan elterjedt lókus (Internal Transcribed Spacer, ITS) régió szekvenálása azok pontosabb azonosításához,
- PMA-qPCR alkalmazása a tenyésztés független mikrobióta-elemzés javításához,
- 30 % glükóztartalmú agar használata az ozmotoleráns mikrobióta kimutatásához,
- Az ozmotikus modellek mátrixhatásainak vizsgálata (pH, antioxidánsok) az aszalt gyümölcsök élethűbb utánpótlásához,
- VBNC indukciós kísérletek végzése tartós stresszhatás alatt (pl. 2 hét vagy több), valamint reszuscitációs lépés alkalmazása és életképesség igazolására irányuló vizsgálatok elvégzése a VBNC sejtek jelenlétének igazolására,
- Különböző előadaptációs táplevesek alkalmazása más gyümölcsök modellezésére,
- Gyakoribb mintavételi időközök az első 30 perc génexpressziós változásainak feltérképezésére (pl. 5 percenként),
- Szélesebb génkészlet vizsgálata az *E. coli* transzkriptomikai elemzéséhez,
- A gamma-sugárzás génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata ozmotikus stressz alatt,
- Annak vizsgálata, hogy a gamma-sugárzás kiváltja-e a VBNC állapotot *E. coli*-ban,
- A szaporodási és stresszkísérletek szobahőmérsékleten történő elvégzése a háztartási tárolási körülmények pontosabb modellezéséhez.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Ez az első olyan vizsgálat, amely a Magyarországon és Ausztriában kereskedelmi forgalomban kapható aszalt gyümölcsök (aszalt sárgabarack, aszalt szilva, mazsola) mikrobiotáját egyaránt tenyésztés függő (tenyésztés és MALDI-TOF MS) és tenyésztéstől független (16S rDNS amplikon szekvenálás) módszerekkel jellemezte.
 - A tenyésztés függő megközelítés során több baktérium- és penészgomba fajt sikerült azonosítanom, köztük a *Pantoea agglomerans*, *Enterococcus mundtii*, *Mixta calida*, *Priestia flexa*, *Aspergillus niger* és *Arthrinium phaeospermum* fajokat, míg a tenyésztéstől független módszer kimutatta a *Mesobacillus*, *Neobacillus* és *Tumebacillus* nemzetségek jelenlétét is. A detektált fajok közül néhány, például a *Pantoea agglomerans*, az *Enterococcus mundtii* és az *Aspergillus niger* opportunistá patogénként is ismert, ami potenciális élelmiszerbiztonsági kockázatot jelenthet az aszalt gyümölcsök esetében.
 - A bakteriális változatosság a mazsolában és az aszalt sárgabarackban jóval nagyobb volt, mint az aszalt szilvában (átlagosan 3,36 nemzetség/minta a mazsolában, 2,70 az aszalt sárgabarackban és 1,62 az aszalt szilvában). Ennek hátterében feltehetően az aszalt szilva polifenol- és antioxidáns-tartalmának mikrobagátló hatása áll.
 - A mazsolában fordult elő a legtöbb egyedileg azonosított baktérium nemzetség (*Pseudomonas*, *Mixta*, *Curtobacterium*, *Kocuria*, *Niallia*, *Alkalihalobacillus*, *Ureibacillus* és *Metabacillus*), ami jól mutatja a gyümölcshöz kötődő, sajátos mikrobiális közösségek jelenlétét.
 - A MALDI-TOF MS és a 16S rDNS amplikon szekvenálás együttes alkalmazása lehetővé tette mind a tenyésztető, mind az alacsony előfordulású taxonok kimutatását, rávilágítva arra, hogy a kis vízakaktivitású élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálatánál kiemelten fontos több módszer kombinált alkalmazása (Dobó et al., 2025).
2. Elsőként sikerült kimutatni, hogy a 0,35 M glükózt tartalmazó közeghez való előadaptáció befolyásolja az *E. coli* törzsek szaporodási képességét.
 - Mind a törzsgyűjteményből származó (ATCC B.02031, CC), mind egy kis vízakaktivitású élelmiszerből (hajdinaliszt) származó izolátum (FI törzs) képes volt szaporodni 0,35 M glükózt tartalmazó ozmotikus közegben, valamint aszalt szilvát imitáló táplevesben (LB kiegészítve 25,5 g/100 g glükózzal, 12,4 g/100 g fruktózzal és 0,15 g/100 g szacharózzal). Továbbá az aszalt szilvát imitáló táplevesben 192 órát stresszelt sejtek visszanyerték szaporodási képességüket LB táplevesbe történő átvitel után, ami a reszuscitáció lehetőségére utal.
 - A 0,35 M glükózhoz való előadaptáció fokozta az *E. coli* (ATCC B.02031, CC) túlélését az aszalt gyümölcsöket imitáló táplevesekben. Az előadaptált sejtek száma szignifikánsan nagyobb volt a nem adaptált mintákhoz képest az aszalt szilvát imitáló táplevesben 4 óra után ($Z = 2,5067$, $p = 0,0122$, $\alpha = 0,05$), valamint a mazsolát imitáló táplevesben 24 óra után ($Z = 2,0889$, $p = 0,0367$, $\alpha = 0,05$).
3. A különböző cukorkoncentrációknak való kitettség, amelyek megfelelnek az aszalt sárgabarackban, aszalt szilvában és mazsolában található értékeknek, egy 96 órás periódust követően mind a törzsgyűjteményi törzsben (ATCC B.02031, CC), mind az kis

vízaktivitású élelmiszerből származó izolátumban (hajdinaliszt, FI) VBNC-szerű (életképes, de nem tenyészthető) állapotot idézhetett elő. Ez az első bizonyíték arra, hogy az aszalt gyümölcsökre jellemző körülmények VBNC-szerű viselkedést válthatnak ki *E. coli* esetében. A VBNC-szerű állapot lehetséges fennállására a PMA-qPCR-alapú életképességi vizsgálatok eredményei és a tenyésztéses módszerrel (lemezöntés) kapott eredmények közötti különbség alapján következtethetünk. A két megközelítés között mért szignifikáns különbségek az aszalt gyümölcsöket utánzó közegekben 24 és 96 óra között (*E. coli* CC törzs: $Z = -2,95$, $p = 0,0031$; *E. coli* FI törzs: $Z = -2,16$, $p = 0,0304$; $\alpha = 0,05$) olyan metabolikusan aktív sejteket jeleznek, amelyek a vizsgált körülmények között nem voltak tenyészthetők.

4. A génexpressziós vizsgálatok kimutatták, hogy három ozmotikus stresszhez kapcsolódó gén (*osmC*, *talA*, *treA*) expressziója 30 perccel az ozmotikus stressz megkezdése után hirtelen megnőtt mindkét *E. coli* törzsben (ATCC B.02031,CC; hajdinalisztból izolált, FI) az aszalt szilvát imitáló táplevesben. Az élelmiszer-eredetű (FI) törzs nagyobb ellenállást mutatott az ozmotikus stresszel szemben, ami feltehetően annak köszönhető, hogy egy alacsony vízaktivitású környezetből (hajdinalisztból) származik.
5. Elsőként sikerült igazolni, hogy a nagy ozmotikus nyomású közegek, melyek jelentős koncentrációban tartalmaznak glükózt (30 %, 50 %), fruktózt (30 %, 50 %) vagy szacharózt (50 %), védőhatást fejtenek ki az *E. coli* törzsgyűjteményéből származó (ATCC B.02031, CC törzs) törzsére gamma-sugárzás alatt. A D-érték nőtt a kontrollhoz képest:

- glükóz esetében 0,32 kGy-ről 0,41 kGy-re és 0,74 kGy-re (30 %, ill. 50 %),
- fruktóz esetében 0,33 kGy-ről 0,41 kGy-re és 0,43 kGy-re (30 %, ill. 50 %),
- míg szacharóz esetében 0,32 kGy-ről 0,42 kGy-re (50 %).

A legerősebb védőhatást az 50 % glükóz biztosította.

Az aszalt szilvát imitáló tápleves szintén védőhatást (mérsékelt) biztosított mind a törzsgyűjteményből származó (ATCC B.02031), mind pedig a kis vízaktivitású élelmiszerből izolált (hajdinaliszt) *E. coli* törzs esetében, hiszen a D-érték 0,31 kGy-ről 0,34 kGy-re (törzsgyűjteményi törzs), illetve 0,36 kGy-re (hajdinalisztból izolált törzs) emelkedett.

6. PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros folyóiratcikk

Dobó, V., Homlok, R., Mohácsi-Farkas, C., and Belák, Á. (2023). Effect of gamma irradiation, high sugar content and antimicrobials on survival of *Escherichia coli*: A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 41(4), 231-247. <https://doi.org/10.17221/235/2022-CJFS>

Dobó, V., Wagner, E., Belák, Á., Peham, T., and Domig, K. J. (2025). Deciphering the microbial composition of dried fruits purchased from Austrian and Hungarian markets using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Control*, 111845. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111845>

Konferenciák

Cefood 2024, Szeged, Hungary. **Dobó, V.**, Belák, Á., Mohácsi-Farkas, C. (poster: Microbiota of dried fruits and the osmotic stress of *E. coli*) 13-16 October 2024

The Miller Online Workshop on Radiation Chemistry. Homlok R., Kiskó G., Kovács A., Tóth T., **Dobó V.**, Takács E., Mohácsi-Farkas Cs., Wojnárovits L., Szabó L. (poszter: Effect of electron beam irradiation and the presence of antibiotics on the population dynamics of resistant/sensitive bacterial cultures in model wastewater matrix). 10-12 February 2022

Third Research Coordination Meeting for CRP “Radiation Inactivation of Bio-hazards Using High Powered Electron Beam Accelerators” (International Atomic Energy Agency). Homlok R., Kiskó G., Kovács A., Tóth T., **Dobó V.**, Takács E., Mohácsi-Farkas Cs., Wojnárovits L., Szabó L. (online előadás: Effect of electron beam irradiation and the presence of antibiotics on the population ratio of resistant/sensitive bacterial in model wastewater matrix). 31 January - 04 February 2022

27th International Symposium on Analytical and Environmental Problems. Szeged, Magyarország. Homlok R., Kiskó G., Kovács A., Tóth T., **Dobó V.**, Takács E., Mohácsi-Farkas Cs., Wojnárovits L., Szabó L. (poszter: Effect of electron beam irradiation and the presence of antibiotics on the population ratio of resistant/sensitive bacteria added prior to advanced oxidation treatment). 22-23 November 2021

A Magyar Tudomány Ünnepe. “Fiatal Talajbiológusok az élhető jövőért” Homlok R., Kiskó G., Kovács A., Tóth T., **Dobó V.**, Takács E., Mohácsi-Farkas Cs., Wojnárovits L., Szabó L. (online előadás: Nagyhatékonyságú oxidációs kezelés és antibiotikumok hatása rezisztens/szenzitív baktériumkultúrák populációs arányára). 12 November 2021

Őszi Radiokémiai Napok, Balatonszárszó. Homlok R., Kiskó G., Kovács A., Tóth T., **Dobó V.**, Takács E., Mohácsi-Farkas Cs., Wojnárovits L., Szabó L. (előadás: A környezeti szempontból jelentős koncentrációjú antibiotikumok hatása a rezisztens/szenzitív baktériumkultúrák populációs arányára, valamint kezelés gyorsított elektronokkal szennyvízmátrixban) 18-20 October 2021

MTA Élelmiszer-tudományi Bizottság 382. Tudományos kollokvium, Budapest. Homlok R., **Dobó V.**, Kiskó G., Kovács A., Tóth T., Takács E., Mohácsi-Farkas Cs., Wojnárovits L., Szabó L. (előadás: Antibiotikum rezisztencia kialakulásának megelőzése szennyvízmátrixokban nagyenergiájú sugárzással). 28 May 2021

The Miller Online Workshop on Radiation Chemistry. Homlok R., Kiskó G., Kovács A., Tóth T., **Dobó V.**, Takács E., Mohácsi-Farkas Cs., Wojnárovits L., Szabó L. (Online Flash prezentáció (3 perc előadás + 2 perc kérdés): Effect of electron beam irradiation and the presence of antibiotics on the population dynamics of resistant/sensitive bacterial cultures in model wastewater matrix with antibiotics and bacteria prior to advanced oxidation treatment). 10-12 February 2022

The Miller Online Workshop on Radiation Chemistry. Homlok R., Kiskó G., Kovács A., Tóth T., **Dobó V.**, Takács E., Mohácsi-Farkas Cs., Wojnárovits L., Szabó L. (Flash video: Effect of electron beam irradiation and the presence of antibiotics on the population dynamics of resistant/sensitive bacterial cultures in model wastewater matrix with antibiotics and bacteria prior to advanced oxidation treatment). 10-12 February 2022

Tartalomjegyzék

- Abed, I. H. (2025). Isolating and identifying microbiological contamination and evaluating the quantity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in dried figs. *Journal of Bioscience and Applied Research*, 11(2), 679-689. <https://doi.org/10.21608/jbaar.2025.442272>
- Alasalvar, C., Chang, S. K., Kris-Etherton, P. M., Sullivan, V. K., Petersen, K. S., Guasch-Ferré, M., and Jenkins, D. J. (2023). Dried fruits: bioactives, effects on gut microbiota, and possible health benefits—an update. *Nutrients*, 15(7), 1611. <https://doi.org/10.3390/nu15071611>
- Alasalvar, C., Salvadó, J. S., and Ros, E. (2020). Bioactives and health benefits of nuts and dried fruits. *Food chemistry*, 314, 126192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126192>
- Beuchat, L., Komitopoulou, E., Betts, R., Beckers, H., Bourdichon, F., Joosten, H., Fanning, S., and Ter Kuile, B. (2011). Persistence and survival of pathogens in dry foods and dry food processing environments. ILSI Europe report series, 2011, 1-48.
- Breisch, J. and Averhoff, B., 2020. Identification of osmo-dependent and osmo-independent betaine-choline-carnitine transporters in *Acinetobacter baumannii*: role in osmoprotection and metabolic adaptation. *Environmental microbiology*, 22(7), pp.2724-2735. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14998>
- Cai, Y., Liu, J., Li, G., Wong, P. K., and An, T. (2022). Formation mechanisms of viable but nonculturable bacteria through induction by light-based disinfection and their antibiotic resistance gene transfer risk: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(20), 3651-3688. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1932397>
- Canakapalli, S. S., Sheng, L., and Wang, L. (2022). Survival of common foodborne pathogens on dates, sundried tomatoes, and dried pluots at refrigerated and ambient temperatures. *Lwt*, 154, 112632. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112632>
- Fu, Y., Jia, Y., Fan, J., Yu, C., Yu, C., and Shen, C. (2020). Induction of *Escherichia coli* O157: H7 into a viable but non-culturable state by high temperature and its resuscitation. *Environmental microbiology reports*, 12(5), 568-577. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12877>
- Hing, J. N., Jong, B. C., Liew, P. W. Y., Ellyna, R. E., and Shamsudin, S. (2022). Gamma Radiation Dose-Response of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Malaysian Applied Biology*, 51(5), 107-112. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i5.2370>
- Hu, X., Wang, X., Ren, H., Li, C., Zhang, B., Shi, R., Wang, Y., Lu, S., Li, Y., Lu, Q., Liu, Z., and Hu, P. (2024). Preliminary Study of the Characterization of the Viable but Noncultivable State of *Yersinia enterocolitica* Induced by Chloride and UV Irradiation. *Microorganisms*, 12(9), 1778. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091778>
- Huang, X., You, Y., Liu, Q., Dong, H., Bai, W., Lan, B., and Wu, J. (2023). Effect of gamma irradiation treatment on microstructure, water mobility, flavor, sensory and quality properties of smoked chicken breast. *Food Chemistry*, 421, 136174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136174>
- Jayeola, V., Farber, J. M., and Kathariou, S. (2022). Induction of the viable-but-nonculturable state in *Salmonella* contaminating dried fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(2), e01733-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01733-21>

- Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grześkowiak, A., Staniszc, E., and Waśkiewicz, A. (2017). Potential health benefits and quality of dried fruits: Goji fruits, cranberries and raisins. *Food Chemistry*, 221, 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.049>
- König, P., Wilhelm, A., Schaudinn, C., Poehlein, A., Daniel, R., Widera, M., Averhoff, B., and Müller, V. (2023). The VBNC state: a fundamental survival strategy of *Acinetobacter baumannii*. *MBio*, 14(5), e02139-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.02139-23>
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., and Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 5, 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Li, S., Tang, Y., Fang, X., Qiao, T., Han, S., and Zhu, T. (2020b). Whole-genome sequence of *Arthrrium phaeospermum*, a globally distributed pathogenic fungus. *Genomics*, 112(1), 919-929. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.06.007>
- Ntuli, V., Chatanga, P., Kwiri, R., Gadaga, H. T., Gere, J., Matsepo, T., and Potloane, R. P. (2017). Microbiological quality of selected dried fruits and vegetables in Maseru, Lesotho. *African Journal of Microbiology Research*, 11(5), 185–193. <https://doi.org/10.5897/ajmr2016.8130>
- O’Sullivan, Ó., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., Claesson, M. J., Stanton, C., O’Toole, P. W., Ross, R. P., and ELDERMET consortium (<http://eldermet.ucc.ie>). (2011). Correlation of rRNA gene amplicon pyrosequencing and bacterial culture for microbial compositional analysis of faecal samples from elderly Irish subjects. *Journal of applied microbiology*, 111(2), 467-473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05067.x>
- Pazos-Rojas, L. A., Cuellar-Sánchez, A., Romero-Cerón, A. L., Rivera-Urbalejo, A., Van Dillewijn, P., Luna-Vital, D. A., Munoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., and Bustillos-Cristales, M. D. R. (2023). The viable but non-culturable (VBNC) state, a poorly explored aspect of beneficial bacteria. *Microorganisms*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010039>
- Rafiepour, P., Sina, S., Amoli, Z. A., Shekarforoush, S. S., Farajzadeh, E., and Mortazavi, S. M. J. (2024). A mechanistic simulation of induced DNA damage in a bacterial cell by X-and gamma rays: a parameter study. *Physical and Engineering Sciences in Medicine*, 47(3), 1015-1035. <https://doi.org/10.1007/s13246-024-01424-x>
- Ringeisen, B., Barrett, D. M., and Stroeve, P. (2014). Concentrated solar drying of tomatoes. *Energy for sustainable development*, 19, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2013.11.006>
- Risiquat, R. O. (2013). Microbiological assessment of date fruits purchased from owode market, in offa, kwara state nigeria. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 4(3), 23-26. <https://doi.org/10.9790/2402-0432326>
- Rybicka, I., Kiewlicz, J., Kowalczewski, P. Ł., and Gliszczyńska-Świgło, A. (2021). Selected dried fruits as a source of nutrients. *European Food Research and Technology*, 247(10), 2409-2419.
- Schoonbroodt, S., Ichanté, J. L., Boffé, S., Devos, N., Devaster, J. M., Taddei, L., Rondini, S., Arora, A. K., Pascal, T., and Malvaux, L. (2023). Real-time PCR has advantages over culture-based methods in identifying major airway bacterial pathogens in chronic obstructive pulmonary disease: Results from three clinical studies in Europe and North America. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1098133. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1098133>

Sévin, D. C., and Sauer, U. (2014). Ubiquinone accumulation improves osmotic-stress tolerance in *Escherichia coli*. *Nature chemical biology*, 10(4), 266-272. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1437>

Shah, A. S., Bhat, S. V., Muzaffar, K., Ibrahim, S. A., and Dar, B. N. (2022). Processing Technology, Chemical Composition, Microbial Quality and Health Benefits of Dried Fruits. *Current Research in Nutrition & Food Science*, 10(1). <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.10.1.06>

Shangguan, Y., Yang, D., Zhao, L., Rao, L., and Liao, X. (2025). High-pressure-induced viable but non-culturable lactic acid bacteria inhibit its post-acidification. *Bioresource technology*, 422, 132221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132221>

Singh, P. K., Verma, A. K., Ranjan, R., Singh, T. P., Kumar, D., and Kumar, P. (2015). Non thermal preservation of meat by irradiation: A review. *J. Food Res. Technol*, 3, 7-13.

Średnicka-Tober, D., Kazimierczak, R., Ponder, A., and Hallmann, E. (2020). Biologically active compounds in selected organic and conventionally produced dried fruits. *Foods*, 9(8), 1005. <https://doi.org/10.3390/foods9081005>

Sun, Z., Cagliero, C., Izard, J., Chen, Y., Zhou, Y. N., Heinz, W. F., Schneider, T. D., and Jin, D. J. (2019). Density of $\sigma 70$ promoter-like sites in the intergenic regions dictates the redistribution of RNA polymerase during osmotic stress in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 47(8), 3970-3985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz159>

Yoon, K. N., Yoon, Y. S., Hong, H. J., Park, J. H., Song, B. S., Eun, J. B., and Kim, J. K. (2023). Gamma irradiation delays tomato (*Solanum lycopersicum*) ripening by inducing transcriptional changes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(13), 6640-6653. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12760>

Zakaria, L., Yee, L. C., and Yee, T. L. (2015). Occurrence of microfungi on several dried fruits. *Malaysian Journal of Microbiology*, 313-316. <https://doi.org/10.21161/mjm.64214>

Zeng, Y., Cao, S., and Yang, H. (2023). Causal associations between dried fruit intake and cardiovascular disease: a Mendelian randomization study. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 10, 1080252. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1080252>

Web 1 - https://knowledge4policy.ec.europa.eu/health-promotion-knowledge-gateway/food-based-dietary-guidelines-europe-table-3_en

Web 2 - https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ar/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B106-1983%252FCXS_106e.pdf

