

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

**Egzotikus állatokból származó tejsavbaktériumok antimikrobiális
komponenseinek vizsgálata**

Szakdolgozat

Hesz Mónika
Biomérnök BSc

Budapest
2024

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: BSc Biomérnök

Modul neve: Alkalmazott Biotechnológia

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Szakdolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Hallgató: Hesz Mónika

A szakdolgozat címe: Egzotikus állatokból származó tejsavbaktériumok antimikrobiális komponenseinek vizsgálata

Konzulens: Dr. Zalán Zsolt, tudományos főmunkatárs

Beadás dátuma: 2024. 11. 04.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	5
2. Szakirodalmi áttekintés	8
2.1. Tejsavbaktériumok	8
2.1.1. Lactobacillus nemzetség	8
2.1.2. Weisella nemzetség	10
2.1.3. Enterococcus nemzetség	11
2.1.4. Pediococcus nemzetség	6
2.2. Tejsavbaktériumok által termelt jótékonyhatású komponensek.....	12
2.3. Tesztorganizmusok bemutatása.....	14
2.3.1. Escherchia coli.....	14
2.3.2. Aspergillus clavatus.....	15
2.3.3. Torulaspora delbureckii.....	15
2.4. Állatkerti gazdaszervezetek.....	16
3. Alkalmazott módszerek (Anyagok és módszerek)	20
3.1. Anyagok.....	20
3.1.1. Tejsavbaktériumok	20
3.1.2. Célorganizmusok.....	21
3.1.3. Tápközegek.....	22
3.2. Módszerek.....	24
3.2.1. Antimikrobiális aktivitás vizsgálata kétrétegű agar diffúziós spot módszerrel	24
3.2.2. A tápközeg és a szaporodás körülményeinek vizsgálata az antimikrobiális aktivitásra.....	26
3.2.3. Sejtmentes felülúszó gátlóaktivitásának vizsgálata agar- lyuk diffúziós módszerrel..	28
3.2.4. A pH hatásának vizsgálata a sejtmentes felülúszó gátlóaktivitására	29
3.2.5. Töményített felülúszó gátló aktivitásának vizsgálata	29
3.2.6. Tejsavbaktérium sejtek közvetlen hatásának vizsgálata penészre kétrétegű agar- módszerrel	29
3.2.7. Fehérjebontó enzimes kezelés hatása a gátló aktivitásra	30
3.2.8. Sejtmembrán – permeabilitási vizsgálat	30
4. Eredmények és értékelésük	32
4.1. A válogatott, egzotikus állatokból izolált tejsavbaktérium törzsek antimikrobiális aktivitása	32

4.2.Különböző szaporodási tényezők hatása a felülúszóba kiválasztott gátló komponensekre	36
4.3. A pH hatása a felülúszóba kiválasztott gátló komponensekre	37
4.4.Töményített felülúszó gátló aktivitása	37
4.5. Különböző koncentrációjú tejsavbaktériumok sejtek közvetlen hatása az A.Clavatus penész szaporodására	40
4.6. Fehérjebontó enzimes kezelés hatása a gátló aktivitásra	43
4.7. Felülúszók sejtmembrán permeabilitásra kifejtett hatása	44
5. Következtetések és javaslatok	45
6. Összefoglalás	47
7. Irodalomjegyzék.....	49

1. Bevezetés és célkitűzések

A tejsavbaktériumok fontos tagjai az emberi és állati bélmikrobiótának egyaránt. A bélmikrobióta szerepe létfontosságú az emberi és állati szervezetekben, mivel védelmet nyújt a szervezetnek és erősíti az immunrendszert. Többségük probiotikus hatással bír, ez a hatás segít a bélbetegségek, rák, laktóz érzékenység és az allergia kialakulásának megakadályozásában. Különböző vegyületek termelésével pedig antimikrobiális hatást is ki tudnak fejteni. A gasztrointesztinális traktus több részből áll, ebből adódóan eltérnek a különböző területeken lévő fizikai és kémiai tulajdonságok, ez okozza, hogy a mikrobiális összetétel is más lesz a gyomorban, vékonybélben és vastagbélben is. Számos vizsgálatot végeztek már az emlősök bélrendszerével kapcsolatban, hogy felfedezzék a bélmikrobióta lakóit, a vizsgálatok során pedig kiderült, hogy milyen sok mikroorganizmust nem ismerünk még a bélrendszerből. Mivel a bélmikrobiomnak még sok tagja ismeretlen, létfontosságú olyan kutatásokat végezni, amelyek segítenek jobban megismerni az ott élő mikroorganizmusokat, azok egymásra kifejtett hatását, hiszen ha a bélmikrobióta megsérül, számos komoly betegséget kaphatunk el. Több kutatást is folytatnak ebben a témában, hogy az új ismeretek megszerzésével ki tudjanak fejleszteni ellenszereket, gyógymódokat az ebből eredő betegségek kezelésére, a haszonállatok és az emberek részére egyaránt. A mikroflórára sok tényező van hatással, például: táplálkozás, gyógyszerkezelés, környezeti hatások, életkor, életmód, de még számos másik dologgal lehetne bővíteni a listát. Ezek a hatások befolyásolják a bélmikrobióta összetételét és funkcióját is, amiknek a megváltozása már súlyos egészségi károsodáshoz vezethetnek. Számos kutatás folyik a bélmikrobióta okozta betegségek kezelésére, jónéhány tanulmány is készült már a témában, például egy 2018-as tanulmánynak a vizsgálata a bélmikrobióta összetételének változását és ennek következményét az emberi szervezetre nézve tárgyalta, a fertőző és gyulladásos betegségek tekintetében. A cikk rámutat, hogy az ilyen jellegű betegségeknel hasznos lenne a bélflórának célzott modulációjával kezelni a betegséget, például székettranszformációval vagy probiotikumokkal. Ez a tanulmány arra is rávilágít, hogy még számos dolog vár felfedezésre az emberi bélmikrobiótával kapcsolatban, de így is sok mindent sikerült már felderíteni a témában [Mukherjee et al., 2018] Egy másik tanulmány hasonló témában inkább a táplálkozásra fekteti a hangsúlyt, olyan megoldásokkal, hogy több probiotikumot és prebiotikumot fogyassunk, illetve magára az egyéni étrend

kialakítására is, hiszen a bélflóra összetétele és az immunrendszer állapota személyenként változó lehet [Wiertsema 2021].

A különböző állatokból izolált mikroorganizmusok és azok tulajdonságainak vizsgálata közelebb vihet minket a bélmikrobióta megismeréséhez, illetve olyan mikorbákat szelektálhatunk, amely a későbbiekben felhasználhatunk számos területen.

Kísérleteimben a hangsúly az antimikrobiális hatásokon volt. Állatkerti állatokból származó tejsavbaktériumokat vizsgáltam. Széles körben van jelentősége ennek a témának, hiszen más élőlényekkel kapcsolatos ismeretek nagy jelentőséggel bírnak az orvoslásban, mezőgazdaságban, természetvédelemben és élelmiszeriparban egyaránt.

Célkitűzés

Három eltérő célorganizmusra (penészgomba, élesztőgomba, baktérium) kifejtett gátló hatást vizsgálva megállapítani 9 állatkerti állatból izolált tejsavbaktériumokból véletlenszerűen válogatott törzsek antimikrobiális aktivitását és meghatározni az antimikrobiális hatást okozó komponenseket.

Ehhez az alábbi kísérleteket terveztem elvégezni:

- Közvetlen antimikrobiális hatás vizsgálata
- Összefüggések vizsgálata a tejsavbaktériumok eredetét és antimikrobiális aktivitást tekintve
- A legjobb antimikrobiális tulajdonsággal rendelkező törzsek kiválasztása
- A gátló komponensek jellegének, tulajdonságainak feltárása

A kísérleteink célja, hogy megvizsgáljuk a különböző élőszervezetekben jelenlévő tejsavbaktériumokat és, hogy milyen gátló hatással rendelkeznek egy adott baktériumra, penészre és élesztőre nézve, e mellett mi okozza a gátló hatást, ha van gátlás a vizsgált tejsavbaktériumnál. További , hogy milyen különbségek vannak a vizsgált állatokban található tejsavbaktériumok között.

Kutatás fő lépései:

1. A vizsgált tejsavbaktériumok gátló hatásainak megfigyelése:

- a) Penészre
- b) Baktériumra
- c) Élesztőre

2. A gátló hatás okának vizsgálata:

- a) Sejtkoncentráció vizsgálata
- b) Sav-hatás, pH függés vizsgálata
- c) Membrán permeabilitás vizsgálata

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Tejsavbaktériumok

A tejsavbaktériumokat tejsav termelésük alapján két nagyobb csoportba sorolhatjuk, heterofermentatív (pl: *Leuconostoc spp.*) és homofermentatív tejsavbaktériumokról (pl: *Lactococcus spp.*) beszélhetünk. A homofermentatív tejsavbaktériumoknál aldoláz enzim segíti a tejsav kialakulását, a heterofermentatív tejsavbaktériumok esetében az aldoláz enzim nincs jelen és más szerves savak is keletkeznek a tejsav mellett. A tejsavbaktériumok a Gram-pozitív baktériumok közé tartoznak, gömb és pálca alakot is felvehetnek, toleránsak az alacsony pH értékkel szemben. Több mint hatvan nemzetség található a tejsavbaktériumok körében.

A tejsavbaktériumokat az ipar számos területén alkalmazzák. Képesek lebontani a poliszacharidokat, ami által tudják javítani az fermentált élelmiszerek minőségét. Fehérjék lebontására is képesek, ennek a tulajdonságnak a segítségével, el tudják távolítani az allergéneket az élelmiszerekből, vagy csökkenteni az allergén hatást. Rengeteg hasznos, bioaktív anyagot is termelnek, ami előnyös az ember, illetve az állatok számára. Javítják a fehérjék emészthetőségét, így növelik a fehérjék tápértékét. A bélrendszer működésére is jótékony hatással vannak, probiotikus hatással rendelkeznek és segítik az aminosavak felszívódását [Fijan, 2014]. Katabolizálják az aminosavakat, amelynek során különböző ízanyagok keletkeznek, azonban a hasznos anyagok mellett, az emberre káros anyagokat is létrehozhatnak a katabolizmus során, biogén anyagokat amelyek a tejsavbaktériumok számára előnyösek a túlélésben, de a nagy számú biogén anyag (pl. biogén aminok) már az ember számára mérgező is lehet [Lonvaud-Funel, 2001]. Az aminosav metabolizmus segít a tejsavbaktériumoknak a savas környezethez való alkalmazkodáshoz is [Even et al., 2002]. Egyéb hasznos tevékenységeikhez tartozik sok káros anyagnak a lebontása, az élelmiszeriparban előszeretettel alkalmazzák többek között ezért is a tejsavbaktériumokat. Néhány példa: a gabona termékekben gátolják a mikotoxinok felhalmozódását, vagy az alkoholos fermentáció során létrejött káros anyagokat. Természetesen ez csak két példa, rengeteg más esetben is fel lehet használni a tejsavbaktériumokat a káros anyagok eltávolítása érdekében. A továbbiakban szót ejtek részletesebben azokról a tejsavbaktériumokról, amikkel dolgoztam a kísérlet során.

2.1.1. *Lactobacillus* nemzetség

A tejsavbaktériumok legnagyobb nemzetsége. Az élelmiszeriparban számos termék előállítására alkalmazzák, többek között fermentált tejtermékek, növényi élelmiszerek és kovász gyártására. Pálca alakú baktériumok, kataláz negatívak és nem képeznek spórát. Három csoportot különböztetünk meg a *Lactobacillus*-ok körében: obligát homofermentatív: pl. *L. acidophilus* ; obligát heterofermentatív: pl. *L. brevis*, fakultatív heterofermentatív: pl. *L. casei*. Sok helyen fellelhetők: szájüreg, bélrendszer, hüvely, trágya és talaj, de mindemellett az élelmiszerek megromlásánál is jelen lehetnek.

- *Lactobacillus paraplantarum*: Megtalálható növényekben, tejtermékekben, húsokban és metazoák gyomor-bél traktusában. Képes túlélni alacsony pH értéken, ennek a tulajdonságának köszönhetően jelen lehet a gyomorban, nyombélben és a vékonybélben is, ráadásul jó hatással van az emberi egészségre. Ha olyan termékeket fogyasztunk, amiben megtalálható ez a baktérium, akkor csökkenthetjük a gáztermelő baktériumok jelenlétét, pl. *Veillonella spp.*.
- *Lactobacillus brevis*: Obligát heterofermentatív és mikroaerofil tejsavbaktérium. Rengeteg helyről tudják izolálni, többek között tejből, sajtból, növényekből, szennyvízből, gabonatermékekből, szilázból, fermentált zöldségekből, fermentált húsokból, tehéntrágyából, ürülekéből, emberek és patkányok szájából és bélrendszeréből is. Számos fermentált ételt állítanak elő a segítségével, de élelmiszer romlást is okozhat, például a sör romlását. Jótékony egészségi hatását is kimutatták, emiatt javasolják az olyan élelmiszerek fogyasztását, amiben jelen vannak ennek a fajnak a képviselői.
- *Lactobacillus salivarius*: Szintén a probiotikus baktériumtörzsekhez tartozik, egy 2020-ban végzett kutatás során kimutatták, hogy hatékony lehet szájüreg rák kialakulásának megakadályozásában. [Kamaluddin et al., 2020]
- *Lactobacillus fermentum*: Obligát heterofermentatív kultúra, rendelkezik probiotikus hatással és többféle sajtban is megtalálható, pl. Comté, Ragusano [Ibrahim, 2016] A neve is mutatja, hogy erjedést okoz, általa állítják elő az egresbort vagy más néven köszméte bort [Campainello, 2017].
- *Lactobacillus plantarum*: Gram-pozitív, aerotoleráns, spóra képző baktérium. Pálca alakja van, egymagában, de párban vagy kicsit hosszabb láncként is előfordul. A tejsavbaktériumok között ő rendelkezik az egyik legnagyobb genommal. Növényekből szokták izolálni, de azért más helyeken is megtalálható: tehéntrágya, tejtermékek,

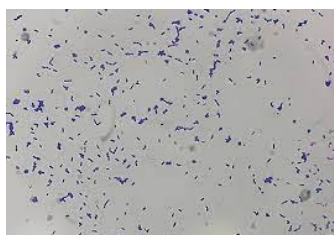
hús- és haltermékek, emberi száj, hüvely, bélrendszer, széklet és szennyvíz [Corsetti et al., 2002]. Az élelmiszerekben, ha nagy számban van jelen, romlást okoz.

- *Lactobacillus sakei*: Cukorból alkoholt és tejsavat képes előállítani, száraz kolbász készítésére és friss hú tartósítására is használják az élelmiszeripar területén [Hammes et al., 2002]
- *Lactobacillus equi*: Egészséges lovakban domináns tejsavbaktérium, emiatt arra következtettek, hogy jó probiotikum lehet az emberek számára is, hiszen a lovaknál hozzájárul az egészséges bélflóra fenntartásához [Masami et al., 2002].

2.1.2. *Weissella* nemzetség

Gram - pozitív baktériumok közé tartoznak, nem képeznek endospórát, pálca és gömb alakot is felvehetnek. Általában húsból, tejtermékből növényekből vagy szennyvízből izolálják [Narvhus 2003]. A *Weissella* nemzetségbe tartozó fajok nagyon változatosak, vannak közöttük olyanok, amelyek probiotikus hatással rendelkeznek , de előfordulnak opportunista kórokozók is a nemzetségben. Kórokozóként rengeteg betegség előidézői lehetnek pl: tőgygyulladást tehenekben, szisztémás fertőzést mona majmokban. Az emberi hüvely és gyomorbél traktus természetes élőhelyei közé tartoznak, emiatt könnyebben okoznak azokon a területeken fertőzéseket. Az általuk okozott betegségek kezelésében nehézséget okozhat, hogy több antibiotikummal szemben is rezisztensek [Fusco et al., 2018].

- *Weissella soli*: A *Weissella* nemzetség egyetlen tagja, amely a talajban megtalálható. Később több növényben is felfedezték, ebből arra következtettek, hogy a valamely földre hullott növény által jut a talajba [Lonvaud-Funel 2014]. Az 1. ábrán látható róla egy mikroszkópikus kép.

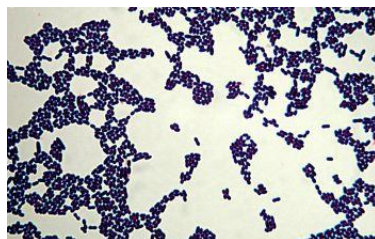


1.ábra: *Weissella soli* (Forrás: Internet 1.)

2.1.3. *Enterococcus* nemzetség

Az *Enterococcus* nemzetség a tejsavbaktériumok egyik legvitatottabb csoportja. A patogén, kommenzalista és hasznos baktériumok széles skáláját foglalja magában. Gram-pozitív, tojásdad alakú tejsavbaktériumok. Számos helyen megtalálhatóak, például különböző madárfajokban, van olyan tanulmány, ami kifejezetten a galambokra való hatását vizsgálja az *Enterococcus* nemzetségnek [Santos et al., 2020]. Élelmiszeriparban sajtok és kolbászek érlelésére használják fel, illetve erjesztett zöldségek készítésére is.

- *Enterococcus faecalis*: Használják probiotikumként és takarmánykiegészítőként, érdekesség, hogy *Enterococcus* fajok közül rajta kívül, csak egy törzs van, amit ilyen célra fel tudnak használni. Az *Enterococcus* fajok közül ő az egyik fő enterocin termelő. Fakultatív anaerob mikroorganizmus, amely az emberi bélrendszerben él, kommenzalizmusban. A gazdaszervezetben képes gyököket képezni, ezáltal vastagbél rákot tud okozni, emellett a férfiaknál húgyúti fertőzést és meddőséget okozhat. [Farsimadan, Motamedifar, 2020]. A vastagbélrák kialakulásában szerepet játszik az *Enterococcus faecalis* szuperoxid termelése. Nehéz az általa okozott betegségeket kezelni, ugyanis sok antibiotikumra rezisztens és rossz környezeti feltételek mellett is képes túlélni [Betzler de Oliveira et al., 2022]
- *Enterococcus casseliflavus*: Szintén egy kórokozó baktérium az *Enterococcus faecalis* mellett. Elsődlegesen a véráramban, húgyúti és műtéti sebfertőzésekért felelős. [Jacopo Monticelli et al., 2018]. Zöld olajbogyó erjesztéséhez használják. Az 2. ábrán látható róla egy mikroszkópikus kép.
- *Enterococcus mundtii*: Az *Enterococcus mundtii* hajlamos depressziót okozni, az *Enterococcus* nemzetségből, ez a faj indukálja legjobban a depressziót [Min-Kyung, 2023] Növények közelségében és nyers húsipari termékekben is megtalálható.
- *Enterococcus hirae*: Egészséges macskákban egyik legelterjedtebb *Enterococcus* faj. Megtalálható az egészséges állat szájüregében, emésztőrendszerében, bőrén és orrüregében [Prescott et al., 2021], emellett megtalálható különböző nyers hústermékekben is.



2.ábra: *Enterococcus casseliflavus* (Forrás: Internet 2.)

2.1.4. *Pediococcus* nemzetség

Gömb vagy ellipszis alakúak lehetnek, csak párokban vagy négyesével helyezkednek el [Gil-Sánchez et al., 2019 ; Feiner, 2006]. Homofermentatív tejsavbaktériumok, növények környezetében találhatóak többnyire, ebből kifolyólag növényi alapú erjesztett élelmiszerekben is megtaláljuk, pl: sör. A tejipari fermentációkban nem nagyon alkalmazzák, ritkán találhatóak csak meg erjesztett sajtban vagy tejben. A fermentációs ipar területén inkább húskészítményeknél és fermentált zöldségeknél használják [Holland et al., 2011].

- *Pediococcus acidilactici*: Erős antibakteriális hatással rendelkezik [Kashyap, 2019]. A sörben kellemetlen savas ízt hoz létre, ennek az oka, hogy képes diacetilt termelni [Harrison, Albanese, 2019].
- *Pediococcus lolii*: Gombaellenes hatással rendelkezik, van olyan tanulmány, ahol 98,8 %-os gátlást mutatott az *Aspergillus niger*-rel szemben [Ebrahimi et al., 2017]

2.2. Tejsavbaktériumok által termelt jótékony hatású komponensek

A tejsavbaktériumok jelentős antimikrobiális hatással rendelkeznek, amely egyrészt a savtermelésüknek és az abból adódó környezeti pH csökkentésnek köszönhető, de emellett számos más hasznos és antimikrobiális anyagot is termelnek.

- Bakteriocinek: Riboszomálisan szintetizált antimikrobiális peptidek [Zacharof, Lovitt, 2012]. Védekező szerepe van, szűk hatásspektrummal rendelkezik.

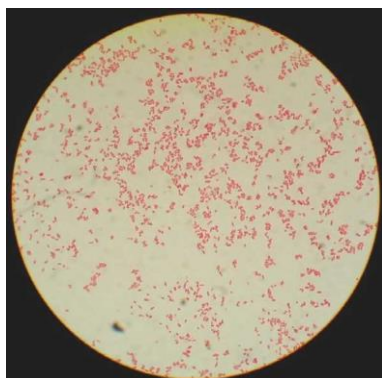
- Zsírsavak): Vannak olyan szénhidrátok, amelyeket a szervezet nem tud lebontani, ezeket a probiotikus baktériumok viszont letudják, így keletkeznek ezek az antimikrobiális hatással rendelkező rövid szénláncú zsírsavak [Thursby et al., 2017] .
- EPS (Exopoliszacharidok): Számos jótékony hatással rendelkeznek a tejsavbaktériumokból származó exopoliszacharidok: daganatellenes, immunstimuláló, antioxidáns és vérkoleszterin csökkentő hatásuk is van [Ghany et al., 2014]. Rengeteg kutatást végeztek és végeznek most is a mikrobiális poliszacharidokkal kapcsolatban és nagyon sok új pozitív dolgot fedeztek fel velük kapcsolatban.
- Oligoszacharidok: Prebiotikumok ,a bélbaktériumok táplálékforrása [Pate, Goyal, 2012]. Serkentik a baktériumok növekedését és más hasznos bioaktív vegyületek termelésében pl: antitestek. A szervezetre való jótékony hatását is bemutatták már több tanulmány során pl: segítik az ásványi anyagok felszívódását [Baye et al., 2017]. Van olyan tanulmány, ami azt is bizonyítja, hogy a probiotikumoknak és prebiotikumoknak együttesen is erős pozitív hatást tudnak kifejteni a bélproblémák területén.
- Enzimek: Termelnek olyan enzimeket, amelyek képesek lebontani a laktózt illetve csökkenteni a laktóz intolerancia kialakulását [Montalto et al., 2006]. Ilyen enzim például a laktáz vagy a béta-galaktozidáz.
- Aminosavak: Segítenek a lipidek és szénhidrátok anyagcseréjének a szabályozásában. Sokféle tulajdonság jellemzi őket, vannak olyan aminosavak amelyek betegségek enyhítésében segítenek, amelyekből ízanyag származtatható, részt vesznek a szervezet egyensúlyának szabályozásában is [Rowland et al., 2018].
- Vitaminok: Az egyik legnagyobb vitamin forrás a tejtermék az ember számára, ez is mutatja mennyire jelentős a tejsavbaktériumok jelenléte és tevékenysége [Said, 2011]. A vitaminoknak számos funkciója van, emiatt létfontosságú a szervezet számára. Segítenek a növekedésben, szaporodásban a szervezet és a test fejlődésében, antitest termelésben, gyorsítja a felszívódást az emésztőrendszerben és vörösvértestek képződésében is fontos szerepet játszanak Az aminosavak, szénhidrátok, zsírsavak metabolikus működéséhez és a nukleinsavak szintéziséhez is elengedhetetlenek [LeBlanc et al., 2017] .
- Immunmoduláló vegyületek: Ezek a vegyületek által alakul ki a szervezetben az immunválasz [Hardy et al., 2013].

- Szerves Savak: A tejsavbaktériumok által termelt szerves savakhoz tartozik például a propionsav, hangyasav, ecetsav és tejsav, de még természetesen lehetne folytatni a sort. Segítenek megelőzni az élelmiszerek romlását és ízfokozók is. Ezeket a savakat, számos területen alkalmazzák az iparban pl: kozmetikai ipar, élelmiszeripar, gyógyszeripar és vegyipar [Bangar et al., 2022]
- Hidrogén peroxid: Lehetőséget látnak abban, hogy felhasználható a hüvely rák elleni kezelésben, több tanulmány is kimutatta, hogy a nők hüvelyében és az állatok hüvelyében egyaránt megtalálhatóak olyan tejsavbaktériumok, amelyek képesek H_2O_2 termelésére. Felelősnek tartják a hüvelyben lévő egyensúly fenntartására. Vigyázni kell viszont, hogy adott szinten tartsuk, ugyanis képes átalakulni nagyon toxikus vegyületekké, amik különböző betegségekhez vezethetnek [Tomás et al., 2004]
- Diacetil: Tejsavbaktériumok által termelt ízanyag, aromás vegyület, amely a citromsav metabolizmus révén jön létre [Yaqi et al., 2021].
- Szén-dioxid: Heterofermentatív tejsavbaktériumok cukor fermentációja során keletkezik, mennyiségét számos tényező befolyásolja [Gibson, 2009].

2.3. Tesztorganizmusok bemutatása

2.3.1. *Escherichia coli*

Gram-negatív, pálcika alakú, nem spóráképző baktérium. Leginkább vastagbélben található, általában ártalmatlan, de vannak olyan szerotípusai, amelyek komoly egészségügyi problémákat tudnak okozni [Dubreuil, 2014]. Leggyakrabban használt modell szervezet, elsősorban kemotaxis-okkal kapcsolatosan alkalmazzák [Aizawa, 2014]. A 3. ábrán látható az *Escherichia coli*-ról egy mikroszkóp alatt készült kép.



3.ábra: *Escherichia coli* (Forrás: Internet 3.)

2.3.2. *Aspergillus clavatus*

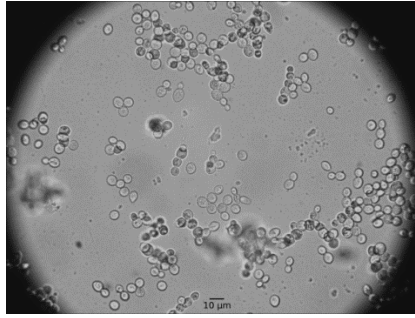
Az *Aspergillus* nemzetséghez tartozik, kék és szürke telepeket hoznak létre. Többnyire gabonaféléken lelhető fel. Malátázás során is feltűnhet például árpa esetében, ha a hőmérséklet túlságosan megemelkedik. Megjelenése során mikotoxinokat termel, ami káros az emberre és az állatokra nézve is. Többféle mikotoxint is termel pl: Patulin vagy citokalazin E [Hocking, 2006]. A 4. ábra megmutatja, hogy néz ki mikroszkóp alatt az *Aspergillus clavatus*.



4.ábra: *Aspergillus clavatus* (Forrás: Internet 4.)

2.3.3. *Torulaspora delbrueckii*

Sejtjei haploid alakúak, askospórái érdesek, erjesztést végez [Kurtzman, 2011]. Alacsony hőmérsékleten is képesek növekedni, szükséges az oxigén a növekedésükhöz, viszonylag magas ozmózisnyomást is kibírnak. Sör és bor készítéshez alkalmazzák az élelmiszeriparban általában [Basso et al., 2016]. A sör készítésénél az ízvilág miatt jelentős a *Torulaspora delbrueckii*, mivel a komlóban jelenlévő monoterpén alkoholokat alakítja át [Hellborg, Piškur, 2009]. Az 5. ábrán látható a *Torulaspora delbrueckii* mikroszkópikus képe.



5.ábra: *Torulaspora delbrueckii* (Forrás: Internet 5.)

2.4. Állatkerti gazdaszervezetek

Sisakos kazuár (*Casuarus casuarius*)



6.ábra: *Casuarus casuarius*

(Forrás: Internet 6.)

Struccalkatú madár, nem tud repülni, kis szárnyai a futásban segítik (6.ábra). Trópusi esőerdőkben, szavannákon, mocsarakban és parti területeken lelhető fel az élőhelye. Élőhelyének körülményiből adódóan Ausztráliában, Pápua-Új Guineában és az Aru-szigeteken kell őket keresnünk. Nem társas élőlény, csak szaporodáshoz társulnak, ettől függetlenül a tojó és a fiókák között nagyon szoros a kötődés. Sokáig élnek, akár 60 évet is leélhet egy sisakos kazuár, ha olyanok az életkörülményei. Mindenevő állat, éjszakai életet él, jól tud alkalmazkodni. Veszélyeztetett faj.

Mhorr gazella (*Nanger dama mhor*)



7.ábra: *Nanger dama mhor*

(Forrás: Internet 7.)

Antilop félék közé tartozik. Nyílt- és füves sztyeppéken, félsivatagokban és sivatagokban él. Élettartamuk átlagosan 12 év. Növényevő, a veszélyeztetett állatfajok közé tartozik. A gazellák közül a legmagasabb faj, lábaik segítik a hőszűrészt, ezáltal tudják biztosítani maguknak a hűtést a forró sivatagi homokkal szemben (7. ábra). Érdekeség, hogy Magyarországon él a legidősebb mhorr gazella^[1] (Forrás: Internet 15.).

Nyugati szürke óriáskenguru (*Macropus fuliginosus*)



8.ábra: *Macropus fuliginosus*

(Forrás: **Internet 8.**)

folyamatosan nőnek (8. ábra).

Kenguru félék családjába tartozik. Ausztráliában őshonos állat. Növényevő, vizes és erdős területeken él. Élettartamuk 9 és 13 év közötti lehet a vadonban, de állatkertben akár a 20 éves kort is megélheti. Az óriáskenguruk között ők a legkisebb természetűek, de a leghangosabbak is. A nőstény jóval kisebb mint a hím, ami annak köszönhető, hogy a nőstény ivarérett korára megáll a növekedésben, míg a hímek felnőtt korukban is

Aldabrai óriás teknős (*Aldabrachelys gigantea*)



9.ábra: *Aldabrachelys gigantea*

(Forrás: **Internet 9.**)

Veszélyeztetett fajnak számít, hüllők osztályába tartozik. Növényevő, de hajlamos kisebb állati tetemeket is megenni. Az Aldabra - szigeteken élnek többnyire, magányos életformát folytatnak. Reggel aktívabbak, akár a 200. életévüket is megtudják élni. Szárazföldi teknős, ha szükséges vizek közelében is tevékenykedik (9. ábra).

Csupasz turkáló (*Heterocaphulus glaber*)



10.ábra : *Heterocaphulus glaber*

(Forrás: **Internet 10.**)

Élőhelyei közé tartozik, Dél-kelet Etiópia, Kenya keleti része, Szomália egész területe. Alagúttrendszereket alakít ki magának, és azokban közlekedik él. Emlősök osztályába, turkálók családjába tartozik. Kolóniában élnek, van egy vezetőjük, a királynő. Gumókat és gyökereket fogyaszt, növényevő. Érdekeség, hogy nem tudja elkapni a rákos megbetegedéseket, szokták mondani, hogy nem öregednek, szervezete gyorsabban regenerálódik és le tudja lassítani a sejtöregedést. Folytatnak többféle kutatást is,

hogy fel tudják használni ezeket a pozitív tulajdonságait az emberi betegségek kezelésére (10. ábra).

Szélesszájú orrszarvú (*Ceratotherium simum*)



11.ábra : *Ceratotherium simum*

(Forrás: **Internet 11.**)

Emlősök osztályába, orrszarvúfélék családjába tartozik. Szavannák, víz közeli helyek és a bozotos területek a számára ideális élőhelyek. Eredetileg Dél-Csádtól Kelet-Afrikáig és Délkelet-Angolától Mozambikig terjedt az élőhelyük, mára sajnos ez már nem jellemző. Növényevő állat, kisebb csoportokban élnek, ha

betolakodnak a területükre más hímek, harcolnak a helyükért, de más élőlényekkel nagyon toleránsak. (11.ábra)

Kis panda=Vörös macskamedve (*Ailurus fulgens*)



12.ábra: *Ailurus fulgens*

(Forrás: **Internet 12.**)

Ragadozó, macskamedve félék családjába tartozik. Élőhelyei köz tartozik Bhután, Kína, India, Laosz, Mianmar és Nepál. Magányos típus, éjszaka éli aktívan az életét. Növényekkel, rovarokkal és madártojásokkal táplálkozik. 10-13 évet élhetnek. Súlyosan veszélyeztetett faj. (12. ábra)

Tarajos sül (*Hystrix cristata*)



13.ábra: *Hystrix cristata*

(Forrás: **Internet 13.**)

Rágcsáló, gyalogsülfélék családjába tartoznak. Észak-Afrikában és Olaszországban a déli részeken található. Elszigetelten és bújóhelyeken szeretik élni az életüket. Magányos állatok közé tartozik, esetenként előfordulhat, hogy párban vannak. Főként éjszakai

életet él. Szabadban 12-15 évet élhet, de fogságban pl: állatkertben sokkal tovább is tud élni, jellemzően mint minden más állat is. Rovarokat, növényeket, gyíkokat és békákat fogyaszt. (13. ábra)

Kétpúpú teve (*Camelus bactrianus*)



14.ábra: *Camelus bactrianus*

(Forrás: **Internet 14.**)

Patások csoportjába, tevefélék családjába tartozik. Szeret vándorolni, homokos és sziklás területeke kedveli, síkságon és hegyvidéken is él. Vándorlásuk során víz közelségébe mennek. Csordában élnek, a kiválasztott hím vezeti a csordát. Alapvetően növényevő, de ha rászorulnak, akkor kisebb tetemeket is megesznek. Nem éjszakai állat, nappal éli az

életét. Víz nélkül is tud élni, akár hónapokig is, de ehhez jó sokat kell inniuk az adandó alkalommal. 50 évig is élhetnek. (14. ábra)

3. Alkalmazott módszerek (Anyagok és módszerek)

3.1. Anyagok

3.1.1. Tejsavbaktériumok

Különböző állatok ürülékéből izolált tejsavbaktériumokat használtam a kísérleteimhez. A törzsek glicerines oldatban -80 °C-on voltak tárolva. Random módon, az izolátumok számkódja alapján választottam ki a kísérletbe bevonni kívánt törzseket.

Mindegyik állatból izolált törzsek közül 5-öt terveztem kiválasztani, de számos törzs nem éledt fel, nem szaporodott fel többszöri leoltás után sem, amelyek helyett újabb izolátumokat választottam annak érdekében, hogy 40 törzset tudjak megvizsgálni. Összesen 88 törzset próbáltam feléleszteni, végül 41 törzset használtam fel a vizsgálatokra. A felhasznált törzsek az 1.-9. táblázatokban láthatók.

Sisakos Kazuár	
SK 19	<i>Lactobacillus salvarius</i>
SK 65	<i>Lactobacillus fermentum</i>
SK 35	<i>Enterococcus hirae</i>
SK 64	<i>Lactobacillus fermentum</i>
SK 57	<i>Enterococcus faecalis</i>

1.táblázat: Sisakos kazuárból izolált törzsek (Forrás: saját munka)

Mohrr Gazella	
MG 11	<i>Enterococcus mundtii</i>
MG 30	<i>Pediococcus acidilactici</i>
MG 7	<i>Pediococcus lolii</i>
MG 84	<i>Pediococcus acidilactici</i>
MG 97	<i>Enterococcus casseliflavus</i>

2.táblázat: Mohrr gazellából izolált törzsek (Forrás: saját munka)

Nyugati Szürke Óriáskenguru	
OK 10	<i>Enterococcus hirae</i>
OK 31	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
OK 41	<i>Enterococcus faecalis</i>
OK 58	<i>Enterococcus mundtii</i>
OK 70	<i>Enterococcus faecalis</i>

3.táblázat: Nyugati szürke óriáskenguruból izolált törzsek (Forrás: saját munka)

Aldabrai Óriás Teknős	
AT 70	<i>Lactobacillus brevis</i>
AT 49	<i>Weissella soli</i>
AT 45	<i>Weissella soli</i>
AT 1	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
AT 3	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>

4.táblázat: Aldabrai óriás teknősből izolált törzsek (Forrás: saját munka)

Csupasz Turkáló	
CS 97	<i>Enterococcus faecalis</i>
CS 82	<i>Enterococcus faecalis</i>
CS 91	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
CS 96	<i>Enterococcus faecalis</i>
CS 4	<i>Enterococcus faecalis</i>

5.táblázat: Csupasz turkálóból izolált törzsek (Forrás: saját munka)

Széles Szájú Orrszarvú	
OR 93	<i>Lactobacillus sakei</i>
OR 9	<i>Enterococcus hirae</i>
OR 79	<i>Lactobacillus equi</i>
OR 96	<i>Pediococcus acidilactici</i>

6.táblázat: Széles szájú orrszarvúból izolált törzsek (Forrás: saját munka)

Tarajos Sül	
TSB 14	<i>Lactobacillus plantarum</i>
TSB 32	<i>Lactobacillus plantarum</i>

7.táblázat: Tarajos sülből izolált törzsek (Forrás: saját munka)

Kis Panda	
KP 53	<i>Enterococcus faecalis</i>
KP 35	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
KP 37	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
KP 48	<i>Enterococcus faecalis</i>

8.táblázat: Kis pandából izolált törzsek (Forrás: saját munka)

Kétpúpu Teve	
TE 53	<i>Ismeretlen</i>
TE 61	<i>Ismeretlen</i>
TE 81	<i>Ismeretlen</i>
TE 80	<i>Ismeretlen</i>
TE 79	<i>Ismeretlen</i>

9.táblázat: Kétpúpu tevéből izolált törzsek (Forrás: saját munka)

3.1.2. Célszervezetek

A gátló szervezetekként három különböző mikroorganizmust, egy penészt, egy baktériumot és egy élesztőgombát választottam, hogy az antimikrobiális aktivitást minél széleskörűbben tudjam vizsgálni.

Penész : *Aspergillus clavatus* B9/6

Megvizsgáltam, hogy a tejsavbaktériumok miként védekeznek a penész ellen. Almáról izolált patulin mikotoxin termelő penész.

Baktérium: *Escherichia coli* O157:H7

Megfigyeltem a tejsavbaktériumok hatását egy baktériumra is.

Élesztő: *Torulaspora delbrueckii*

Végül egy élesztőt is választottam, hogy megnézzem a tejsavbaktériumok gátló mechanizmusát egy élesztőgombára is.

3.1.3. Tápközeg

- A. MRS Tápleves :** Kifejezetten a *Lactobacillus* nemzetség számára kifejlesztett táptalaj [De Man et al., 1960], amely azonban alkalmazható egyéb tejsavbaktériumok szaporítására is. MRS táplevesben történt a tejsavbaktériumok felélesztése. A tápközeget a gyártó leírása szerint készítettem el. Autoklávban sterilizáltam 121 °C-on 15 percen keresztül. A tápközeg pontos összetétele a 10. táblázatban található.

Tartalom	Mennyiség
MRS por	53 g
Desztillált víz	1000 ml

10.táblázat: MRS táptalaj összetétele (Forrás: saját munka)

- B. MRS Tápagar:** Ugyanúgy készül, mint a tápleves, de agarral van kiegészítve és a homogenizálás és az agar oldódása érdekében autoklávozás előtt felforraltam.

Autoklávban sterilizáltam 121 °C-on 15 percen keresztül. A tápagar pontos összetétele a 11. táblázatban olvasható.

Tartalom	Mennyiség
Agar	15 g
MRS Broth	55,3 g
Desztillált víz	1000 ml

11.táblázat: MRS tápagar összetétele (Forrás: saját munka)

- C. Malt Extract Tápagar:** *Aspergillus* penész számára ajánlott tápagar. Elkészítés után homogenizáltam, forraltam és sterilizáltam, ugyanolyan körülmények között, mint a többi táptalajt. A Malt Extract tápagar összetétele megtalálható a 12.táblázatban.

Tartalom	Mennyiség
Agar	7,5 g
Pepton	5 g
Maláta kivonat	30 g
Desztillált víz	1000 ml

12.táblázat: Malt Extract tápagar összetétele (Forrás: saját munka)

- D. Tápleves az *E. coli* számára:** Homogenizáltam és 10 ml-ként kémcsőbe pipettáztam a táplevest. Autoklávban sterilizáltam 121 °C-on 15 percen keresztül. A tápleves összetétele a 13. táblázatban megtalálható.

Tartalom	Mennyiség
Nutrient Broth	6,5 g
Desztillált víz	1000 ml

13.táblázat: Az *E. coli* táplevesének összetétele (Forrás: saját munka)

- E. Nutrient Tápagar:** Homogenizáltam és felforraltam a táptalajt. Autoklávban sterilizáltam 121 °C-on 15 percen keresztül. A tápagar összetétele látható a 14. táblázatban.

Tartalom	Mennyiség
Agar	7 g
Nutrient Broth	6 g
Desztillált víz	1000 ml

14.táblázat: Nutrient tápagar összetétele (Forrás: saját munka)

- F. Tápleves az élesztőnek (YPD):** Homogenizáltam, szétosztottam 10 ml-ként kémcsövekbe. Autoklávban sterilizáltam 121 °C-on 15 percen keresztül. A 15. táblázatban megtalálható a *Torulaspora delbrueckii* számára előállított tápleves összetétele.

Tartalom	Mennyiség
Élesztőkivonat	10 g
Pepton	20 g
Dextrose	20 g
Desztillált víz	1000 ml

15.táblázat: Az élesztő táplevesének összetétele (Forrás: saját munka)

G. Tápagar az élesztőnek: Az összetétel tartalma a 16. táblázatban látható.

Tartalom	Mennyiség
Agar	15 g
Élesztőkivonat	10 g
Pepton	20 g
Dextrose	20 g
Desztillált víz	1000 ml

16.táblázat: Élesztőnek szánt tápagar összetétel (Forrás: saját munka)

H. Tápleves a gátló komponensek tápközegtől való függésének meghatározásához:

- TSY: Tripton, szóját és élesztő kivonatot tartalmaz (Kezein pepton: 17 g/l, nátrium-klorid: 5g/l, szója pepton: 3 g/l, glükóz: 2,5 g/l, dikálium-hidrogén-foszfát.
- MRS tápleves (A. pont, 10. táblázat)

I. Enzim: Pepszin (Sigma-Aldrich, P7012, 2860 U/mg)

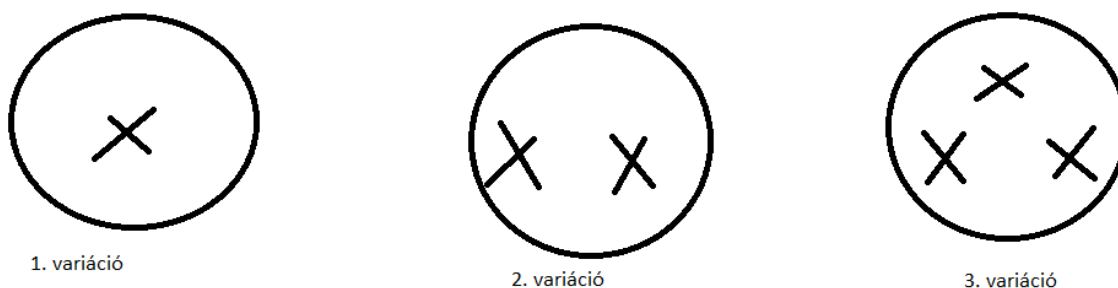
J. Fiziológias sóoldat

3.2. Módszerek

3.2.1. Antimikrobiális aktivitás vizsgálata kétrétegű agar diffúziós spot módszerrel

A tejsavbaktériumok penész, baktérium és élesztő elleni hatását ezzel a módszerrel vizsgáltam. Első körben egy próba-vizsgálatot végeztem. Kiválasztottam 4 állatot és mindegyikből 2-2 izolált tejsavbaktériumot. Felolvasztottam a tápagart, miután lehűlt körülbelül 50 °C-ra, kiöntöttem a lemezeket, majd hagytam megszilárdulni és minél több nedvességet elpárologni a tápközegből. Átoltottam a kiválasztott törzseket friss táplevesekbe miután vortex segítségével felkevertem a kémcsövek tartalmát, mindegyikből 100-100 µl-t oltottam át az előző átolásból. Az átolás másnapján feliratoztam a lemezeket, 3 féleképpen csöppentettem le a törzseket, a 3 különböző módot a 15. ábrán szemléltetem. Egy petricsészébe csak egy törzset oltottam le, mindegyiket három féle módon. Az 1. és 2. variációnál 20-20 µl-t, a 3. variációnál 10-10 µl-t cseppentettem le a törzsekből. Száradást követően a lemezeket 37 °C-os

inkubátorba helyeztem 48 órára. Felolvasztottam a Malt Extract tápagart, miután lehűlt megfelelő hőmérsékletre, belepipettáztam a korábban meghatározott spóraszámú ($1,8 \times 10^6$ spóra/ml) *Aspergillus clavatus* B9/6 penész-spóra szuszpenzióból 200 µl-t, úgy, hogy a penészspórák végkoncentrációja 10^3 spóra/ml legyen, óvatosan mozgatva elkevertem homogenizálás céljából, majd ráöntöttem a két napig inkubálódott, tejsavbaktériumokkal már leoltott petricsészék felületére. (A petricsészéket mind feliratoztam, elláttam a megfelelő dátummal és jelöltem rajta a lecsöppentés helyét, minden leoltást fülke alatt végeztem, a penész leoltását pedig láng mellett.)



15.ábra: Leoltási variációk (Forrás: saját munka)

A három variációból kiválasztottam a legkedvezőbbet a további kísérletekhez. Három nap után megmértem a gátlási zónákat és az alapján eldöntöttem, hogy melyik megoldás lesz a jó a további kísérletekhez. A legmegfelelőbbnek a 2. módszer bizonyult. A további vizsgálatoknál ugyanezt a módszert használtam a gátló tulajdonság megvizsgálására.

Az *E. coli* esetében hígítási módszerrel határoztam meg a megfelelő koncentrációt a gátló hatás vizsgálatára, a hígítási sorhoz tartozó adatok megtekinthetők az 17. táblázatban. Készítettem egy 10-szeres, 100-szoros és egy 1000-szeres hígítást. A hígítási sort Eppendorf csövekbe készítettem el, majd petricsészékbe pipettáztam és lemezöntést végeztem Nutrient agarral.

	0.	1.	2.	3.
Desztillált víz	0 µl	900 µl	990 µl	999 µl
<i>E. coli</i>	1000 µl	100 µl	10 µl	1 µl

17.táblázat: *E. coli*-ből előállított hígítási sor (Forrás: saját munka)

Az eredmények alapján a 100-szoros hígítást választottam a további vizsgálatokhoz. Az élesztő számára is készítettem egy hígítási sort, hogy meg tudjam állapítani, hogy a későbbiekben milyen mennyiségben oltsam le. Készítettem egy 10-szeres és egy 100-szoros hígítást. A hígítással kapcsolatos adatok megtekinthetők a 18. táblázatban. A hígítási sor elkészítése után lecsöppentettem 1-1 ml-t a petricsészébe és lemezőntést végeztem YPD agarral.

	0.	1.	2.
Desztillált Víz	0 μ l	900 μ l	990 μ l
Élesztő	1000 μ l	100 μ l	10 μ l

18.táblázat: *Torulaspora delbrueckii*-ből előállított hígítási sor (Forrás: saját munka)

3.2.2. A tápközeg és a szaporodás körülményeinek vizsgálata az antimikrobiális aktivitásra

A négy kiválasztott törzset elszaporítottam anaerob és aerob körülmények között két különböző táptalajban TSY és MRS tápközegekben. Az aerob körülmények megegyeztek az eddigi szaporítási műveletekkel. Anaerob környezetet pedig úgy biztosítottam, hogy jarokba helyeztem őket, amibe AnaeroGen, anaerob környezetet biztosító zsákokat (Oxoid) helyeztem és légmentesen lezártam, így oxigén mentes környezetben tudtak növekedni (16 - 19. ábra).



16.ábra: Elszaporított törzs a jarban. (Forrás: saját munka)



17.ábra: Elszaporított törzsek a jarokban. (Forrás: saját munka)



18.ábra: Törzsek elszaporítása az anaerob jarok-ban. (Forrás: saját munka)



19.ábra: Törzsek elszaporítása aerob körülmények között: 1.sor: MRS tápközegben, 2.sor: TSYE tápközegben (Forrás: saját munka)

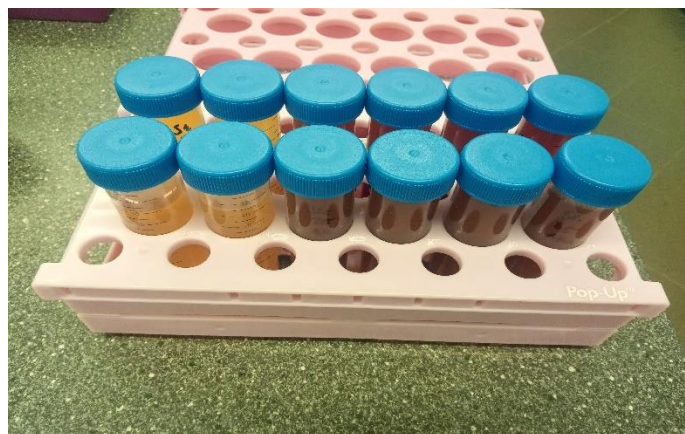
3.2.3. Sejtmentes felülúszó gátló aktivitásának vizsgálata agar-lyuk diffúziós módszerrel

3.2.3.1. Felülúszó készítése

Felülúszót készítettem a mintákból (SK35: aerob MRS, anaerob MRS, aerob TSY, anaerob TYS; OK70: aerob MRS, anaerob MRS, aerob TSY, anaerob TSY; OK41: aerob MRS, aerob TSY, anaerob TSY). Mindegyik mintából kimértem 50-50 ml-t centrifugacsövekbe 20. ábrán látható. Centrifugáltam 4000 rpm-en, 4°C-on 20 percen keresztül a mintákat, hogy megkaphassam a felülúszót. A centrifugálás után óvatosan leöntöttem a kapott sejtmentes felülúszót újabb centrifuga csövekbe, hogy a leülepedett sejt ne kerüljön át a felülúszóba. A felülúszóban található, a sejtek által esetlegesen kiválasztott enzimek inaktiválása érdekében a mintákat 80°C-os vízfürdőben hőkezelttem 10 percen keresztül. A felülúszókat steril 0,22 µm-es szűrőn, fecskendő segítségével átszűrtem.

3.2.3.2. Agar-lyuk diffúziós módszer

A penész és az *E. coli* számára felolvasztottam a táptalajt. Az *E. coli* táptalajából 500 ml-t készítettem, amibe 10 ml *E. coli*-t pipettáztam. A penész táptalajba 1 ml penész spórát pipettáztam, ami 500 ml volt szintén. Enyhe rázogatással elegyítettem a spórákat és a baktériumot a tápközegekkel. 20-20 lemezt öntöttem a vizsgált mikroorganizmusokkal beoltott táptalajokkal, megszáradás után mindegyikre 4 lyukat fúrtam egy 10 mm átmérőjű steril lyukfúróval, majd mindegyik lyukhoz társítottam megfelelő feliratot. A kifúrt lyukakba belepipettáztam a felirathoz tartozó sejtmentes felülúszó mintából 100 µl-t. 4°C-ra behelyeztem a hűtőbe a mintákat, a jobb diffundálás érdekében 10 percre, majd a 10 perc lejártá után inkubátorba tettem őket (penész esetén 25 °C-ra, az *E. coli* esetén 37 °C-ra). A gátlás mértékét a lyukak körül kialakuló feltisztulási zóna nagyságából határoztam meg. A gátlási zóna gyűrűjének szélességét a lyuk szélétől mért távolsággal, mm-ben kifejezve határoztam meg.



20.ábra: Felülúszók készítése (Forrás: saját munka)

3.2.4. A pH hatásának vizsgálata a sejtmentes felülúszó gátló aktivitására

A mintáknak megmértem a pH-ját, majd beállítottam $7 \pm 0,2$ értékre 4 M NaOH oldat segítségével. A műszert használat előtt kalibráltam, az elektródát minden mérés után lemostam. A mintákat fecskendőszűrőn ($0,22 \mu\text{m}$) sterilre szűrtem. A minták vizsgálatát az agar-lyuk diffúziós módszerrel a 3.2.3.2. bekezdésben leírtak szerint végeztem el.

3.2.5. Töményített felülúszó gátló aktivitásának vizsgálata

Liofilizáltam a felülúszókat (Christ Alpha 1-4, Martin Christ GmbH, Németország) 15 ml-enként, majd a liofilizált felülúszókhoz 1,5 ml desztillált vizet adagoltam, hogy feloldjam benne a vízmentes komponenseket. Feloldás után eppendorf csövekbe pipettáztam át őket. 250 ml *E. coli* számára alkalmas tápközegbe 2,5 ml *E. coli*-t adagoltam, a penésznek összeállított MEA táptalaj 250 ml volt, amibe 0,3 ml penész spórát tettem. Mindkettő leoltott tápközeget elegyítettem enyhe rázogatással. 24 lemezt öntöttem le, 12 lemezt a penésznek, 12 lemezt az *E. coli*-nak. A megszáradt lemezekbe 4-4 lyukat fúrtam egy 10 mm átmérőjű steril lyukfúróval, a lemezeket feliratoztam, és a megfelelő felülúszóból 100 μl -t pipettáztam az adott lyukba.

3.2.6. Tejsavbaktérium sejtek közvetlen hatásának vizsgálata penészre kétrétegű agar-módszerrel

10-szeres, 100-szoros, 1000-szeres és egy 10 000-szeres hígítást és azokból lemezöntést végeztem tejsavbaktériumokkal MRS agar alkalmazásával, hogy megvizsgáljam a sejtek közvetlen hatását a penész szaporodására. Minden törzsből készítettem egy hígítási sort, minden hígításhoz tartozott egy párhuzamos, illetve még 2 kontroll lemezt (csak MRS agar) is

leoltottam. A lemezek megszilárdulása után, ráöntöttem a penész számára előállított agart (MEA), majd annak megszilárdulását követően a penész-spóra szuszpenzióból 10 µl-t csöppentettem minden Petri-csésze közepére. A lemezeket 25 °C-os inkubátorba helyeztem és egy-két naponta mértem a kialakuló penésztelep átmérőjét.

3.2.7. Fehérjebontó enzimes kezelés hatása a gátló aktivitásra

2 mg pepszint 200 µl desztillált vízben feloldottam. A töményített felülúszóval végzett gátlási vizsgálat eredményei alapján az SK35 és az OK70-es törzzsel dolgoztam tovább, mindkettőből csak az MRS táptalajon aerob és anaerob körülmények között elszaporítással végeztem a kísérletet. Mivel az *E. coli* mutatta a legnagyobb érzékenységet a felülúszó komponenseivel szemben, csak az *E. coli*-t vizsgáltam a továbbiakban. Mindegyik felülúszóból 500-500 µl-t kimértem 1-1 eppendorf csőbe. A felülúszókhoz adtam az enzimoldatból 50-50 µl-t és betettem őket 37 °C-ra az inkubátorba 2 óra hosszára. A pepszin nélküli kontroll-felülúszókat is hígítottam hogy egységesen hígítva legyenek a minták. A két órás inkubációt követően az enzimet 80 °C-os 1 perces hőkezeléssel inaktiváltam, majd lehűtöttem. 250 ml Nutrient tápagarba 2,5 ml *E. coli*-t adtam és elegyítettem. Kiöntöttem vele 4 db lemezt, amibe megszáradás után 4-4 lyukat fúrtam, elláttam felirattal, és bele pipettáztam 100-100 µl-t az pepszin nélküli és az enzimkezelt felülúszókból. Mindegyikből 2 párhuzamost készítettem.

3.2.8. Sejtmembrán-permeabilitási vizsgálat

A vizsgálathoz a következő összetételű mintákat állítottam össze:

- 2,5-2,5 ml 6 db felülúszó (SK35, OK41, OK70 -aerob/anaerob) +2,5 ml *E. coli*
- 2,5 ml fizsó +2,5 ml *E. coli*
- 2,5 ml MRS + 2,5 ml *E. coli*
- 2,5-2,5 ml 6 db felülúszó + 2,5 ml fizsó

Ezeket az oldatokat 15 ml-s centrifugacsövekbe mértem ki, egyes mintákból 2 párhuzamost, más mintákból 4 párhuzamost készítettem, mindegyik mintát 2-szer készítettem el, mert 0. pillanatban mért és egy 2 órás mintát is összeállítottam. A 2 órás mintákat 37 °C-ra előmelegített vízfürdőbe helyeztem, 2 órára. A minták másik felét centrifugáltam 4000 rpm-en, 10 percen keresztül 15 °C-on. A centrifugálás következtében létrejött felülúszókat átöntöttem küvettákba és lemértem 260 és 280 nm-en is spektrofotométer segítségével

(Thermo Scientific NanoDrop) az abszorbancia értéküket Zhou és munkatársai (2022) alapján. A két óra leteltével, ugyanilyen körülmények között szintén lecentrifugáltam a 2 órás mintákat is és szintén megmértem az abszorbanciájukat.

4.Eredmények és értékelésük

4.1. A válogatott, egzotikus állatokból izolált tejsavbaktérium törzsek antimikrobiális aktivitása

A törzsek gátlásáról a mérési eredményeket a 19. táblázatban foglaltam össze hőtétkép formájában, ami segítségül szolgált a soron következő vizsgálatokhoz a megfelelő törzsek kiválasztásában.

	Penész	Élesztő	E.Coli
SK19	5	N	6,7
SK65	6	N	5,54
SK35	14,5	0	9,5
SK64	N	N	8
SK57	N	N	0
MG97	0	N	7,3
MG30	0	0	7,5
MG84	0	0	9
MG67	0	0	12
MG11	0	N	0
OK10	0	0	11
OK70	0	0	16,5
OK41	8	0	26
OK58	0	0	0
OK31	0	0	11

	Penész	Élesztő	E.Coli
AT70	0	0	8,5
AT49	0	n	0
AT45	13,5	0	2,5
AT1	N	0	9,25
AT3	5	N	9,3
CS97	0	0	6
CS82	0	N	0
CS91	0	0	0
CS96	0	N	0
CS4	N	0	0
OR9	0	0	2,7
OR93	0	0	0
OR79	30	0	7,5
OR96	n	N	11,7
TSB14	0	0	4,7

TSB32	0	0	0
-------	---	---	---

	Penész	Élesztő	E.Coli
KP53	0	N	0
KP35	0	0	0
KP37	0	N	0
KP48	0	0	0
TE53	0	0	0
TE61	0	0	9
TE81	0	0	0
TE80	0	0	0
TE79	0	N	0

19.táblázat: Hőtérvkép a tejsavbaktériumok gátlásairól mm-ben kifejezve *Aspergillus clavatus*-szal, *Escherichia coli*-val és a *Torulaspora delbrueckii*-vel szemben. (Jelölés: N-nem vizsgáltam az adott mikroorganizmusra.) (Forrás: saját munka)

A penésszel szembeni gátló hatás nem jelentkezett sok törzsnél. Az élesztőre semelyik tejsav baktérium nem mutatott gátló aktivitást, ebből kifolyólag nem használtam a későbbi kísérletek során. Az *E. coli*-t gátolta a legtöbb tejsavbaktérium, tehát a kiválasztott baktériumot tudták legjobban gátolni. Általános gátló aktivitásra vonatkozó következtetést azonban nem lehet levonni az eredmények alapján. A későbbi kísérletek megvalósításához próbáltam olyan baktériumokat választani, melyek *E. coli* és penész ellen jó gátló aktivitást mutattak, sajnos azonban volt olyan törzs a kiválasztottak között, amelyet a további kísérletek során nem tudtam feléleszteni és újra elszaporítani, szóval egy kevésbé jó gátló törzset kellett választanom.

A hőtérvkép alapján az OR79; OK41; SK35; OK70 törzseket választottam. AZ OR79 kivételével az összes törzs az *Enterococcus* nemzetségbe tartozik, az OR79 pedig a *Lactobacillus* nemzetségbe. Az aerob és anaerob körülmények közötti elszaporítás után, sajnos az OR79 törzzsel nem jártam sikerrel, nem nagyon akart újra elszaporodni, emiatt nem vizsgáltam tovább, az OK41-es törzs pedig MRS táptalajon, anaerob körülmények között szintén nem szaporodott el, így azt sem tudtam a felülúszók tekintetében vizsgálni.

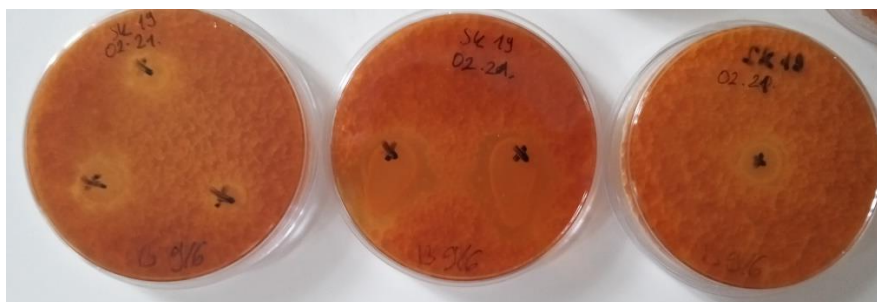
A végső kiválasztott törzsek a 20. táblázatban láthatók:

Törzsek	
SK 35	Sisakos kazuár
OK 70	Szürke óriáskenguru

OK 41	Szürke óriáskenguru
OR 79	Széles szájú orrszarvú

20.táblázat: A kiválasztásra került törzsek (Forrás: saját munka)

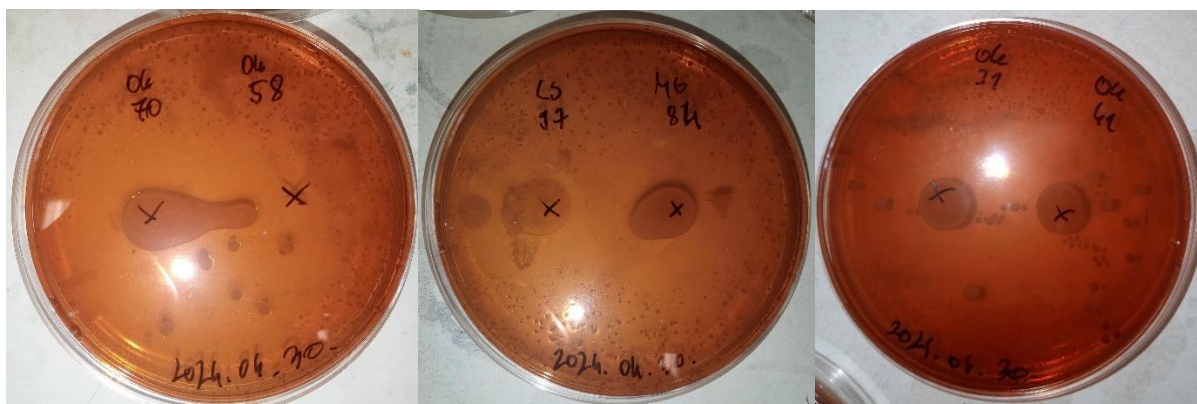
A 21.- 24. ábrán az *Aspergillus clavatus*-szal, *E. coli*-val és *Torulaspora delbrueckii*-vel szemben végzett kísérletek eredményeiből látható egy-egy példa.



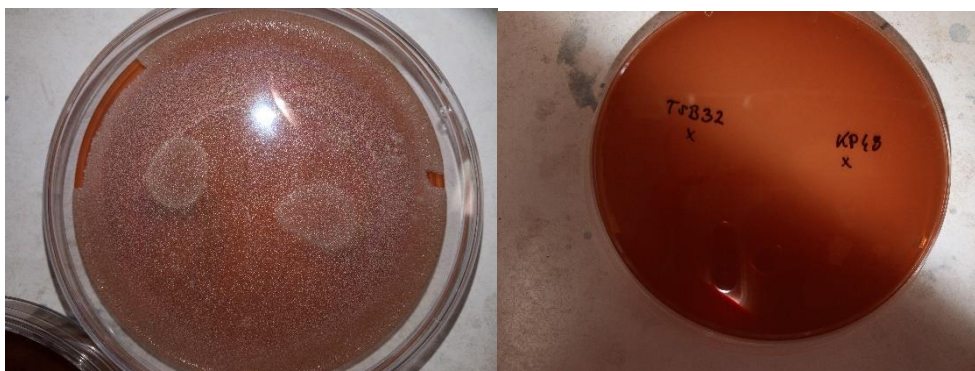
21.ábra: *Aspergillus clavatus*-szal szembeni gátlás (Forrás: saját munka)



22.ábra: *Aspergillus clavatus*-szal szembeni gátlás (Forrás: saját munka)



23.ábrák: *E. coli*-val szembeni gátlás (Forrás: saját munka)



24.ábrák: *Torulaspora delbrueckii*-vel szembeni gátlás (Forrás: saját munka)

4.2. Különböző szaporodási tényezők hatása a felülúszóba kiválasztott gátló komponensekre

Eredeti pH értékek: A 21. táblázatban láthatóak a lemért pH értékek a beállítás előtt.

MRS		TSYE		
Anaerob	Aerob	Anaerob	Aerob	
4,34	4,34	4,82	4,81	OK70
N	5,14	4,81	4,83	OK41
3,83	3,81	4,96	4,91	SK35

21.táblázat: Az felülúszók eredeti pH értékei. (Forrás: saját munka)

A) Páros minta statisztika

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 OK70MRSaE	,28067	3	,056536	,032641
SK35MRSaE	,43333	3	,057735	,033333
Pair 2 SK35MRSaE	,43333	3	,057735	,033333
SK35MRSAn	,40833	3	,028868	,016667

A) Páros T-próba

	Paired Differences	t	df	
--	--------------------	---	----	--

		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	OK70MRSAe - SK35MRSAe	-,152667	,067796	,039142	-,321082	,015749	-3,900	2	,060
Pair 2	SK35MRSAe - SK35MRSAn	,025000	,086603	,050000	-,190133	,240133	,500	2	,667

¹**22.Táblázat.** Az eredeti felülúszók *E. coli*-ra kifejtett gátlási aktivitásának (feltisztulási zóna, cm) statisztikai kiértékelése A) Páros minta statisztika, B) páros T-próba (Forrás: saját munka)

A statisztikai próbából megállapítható, hogy nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$) sem az egyes törzsek (OK70, SK35) felülúszóinak gátló aktivitása, sem az SK35 törzs MRS-en aerob és anaerob körülmények mellett termelt gátló komponenseinek aktivitása között. Tehát a szaporítás körülménye nem befolyásolta a termelt antimikrobiális komponensek gátló aktivitását.

A statisztikai kiértékelést SPSS Statistics (Version 22, IBM Corporation) programmal végeztem.

A penész esetében nem tapasztaltam gátlást, az erről készült fénykép a 26. ábrán látható. Emiatt a következő lépésben szerettem volna megvizsgálni a felülúszók penésszel szemben gátló aktivitását, olyan módon, hogy töményítem a felülúszót, hátha mutatnak gátló hatást, ha a kiválasztott gátló komponensek nagyobb koncentrációban vannak jelen. Az *E. coli*-val szemben szép gátlási zónákat tudtam mérni, de csak a MRS táptalajon termeltek antimikrobiális anyagokat, a TSYE tápközegben sajnos nem, ebből arra tudtam következtetni, hogy van jelentősége a tápközegnek a gátlási zónák kialakulásában. A törzsek között egyedül az OK41 nem volt képes gátlásra az *E. coli*-val szemben, az erről készült fotó a 25. ábrán látható. A gátlási zónák értékeinek statisztikai kiértékelését a 22. táblázat mutatja be.

¹ OK70MRSAe: az OK70-es törzs felülúszója MRS-en, aerob körülmények között szaporítva, SK35MRSAe: az SK35-ös törzs felülúszója MRS-en, aerob körülmények között szaporítva, SK35MRSAn: az SK35-ös törzs felülúszója MRS-en, anaerob körülmények között szaporítva.



25.ábra: Gátlási zónák az *E. coli*-val szemben az eredeti töménységű felülúszóval (Forrás: saját munka)



26.ábra: Sikertelen gátlás az *Aspergillus clavatus*-szal szemben az eredeti töménységű felülúszóval (Forrás: saját munka)

4.3. A pH hatása a felülúszóba kiválasztott gátló komponensekre

A pH beállított környezetben nem tapasztaltam gátlást, tehát a pH-nak hatással kell lennie a gátló anyagra, hiszen a pH beállítottaknál nem alakult ki gátlási zóna, viszont azoknál a mintáknál, ahol nem állítottam be a pH-t, hanem meghagytam az eredeti formában, ott gátlási zónák alakultak ki. Feltételezni lehet, hogy a gátló komponens savas környezetben működik vagy az alacsony pH okozta a gátlást.

4.4. Töményített felülúszó gátló aktivitása

A) Páros minta statisztika

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	OK70MRSAe	,6133	3	,02517	,01453
	OK70MRSA _n	,7633	3	,13503	,07796
Pair 2	SK35MRSAe	1,4700	3	,26000	,15011

	SK35MRSAn	1,4633	3	,13503	,07796
Pair 3	OK70TSYEAe	,2867	3	,01528	,00882
	OK70TSYEAAn	,2800	3	,02000	,01155
Pair 4	OK70MRS Ae	,6133	3	,02517	,01453
	SK35MRS Ae	1,4700	3	,26000	,15011
Pair 5	OK70MRSAn	,7633	3	,13503	,07796
	SK35MRSAn	1,4633	3	,13503	,07796
Pair 6	OK70MRS Ae	,6133	3	,02517	,01453
	OK70TSYEAe	,2867	3	,01528	,00882
Pair 7	OK70MRSAn	,7633	3	,13503	,07796
	OK70TSYEAAn	,2800	3	,02000	,01155

B) Páros T-próba

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	OK70MRS Ae - OK70MRS An	-,15000	,11000	,06351	-,42326	,12326	-2,362	2	,142
Pair 2	SK35MRS Ae - SK35MRS An	,00667	,12503	,07219	-,30393	,31727	,092	2	,935
Pair 3	OK70TSY Ae - OK70TSY An	,00667	,00577	,00333	-,00768	,02101	2,000	2	,184
Pair 4	OK70MRS Ae - SK35MRS Ae	-,85667	,28501	,16455	-1,56468	-,14865	-5,206	2	,035
Pair 5	OK70MRS An - SK35MRS An	-,70000	,27000	,15588	-1,37072	-,02928	-4,491	2	,046
Pair 6	OK70MRS Ae - OK70TSY Ae	,32667	,01155	,00667	,29798	,35535	49,000	2	,000

Pair 7	OK70MRSA ⁿ - OK70TSYEAn	,48333	,11504	,06642	,19757	,76910	7,277	2	,018
--------	---------------------------------------	--------	--------	--------	--------	--------	-------	---	------

²**23.Táblázat:** A töményített felülúszók *E. coli*-ra kifejtett gátlási aktivitásának feltisztulási zóna, cm) statisztikai kiértékelése A) Páros minta statisztika, B) páros T-próba (Forrás: saját munka)

A töményítés hatására már jelentős különbségeket tapasztaltam a minták gátló aktivitása között. A statisztikai próbából megállapítottam, hogy a gátlás mértékében szignifikáns különbség ($p < 0,05$) van az egyes törzsek között (OK70, SK35), mind az aerob és anaerob szaporítás mellett, amelyek közül az SK35 törzs mutatott jelentősebb gátló aktivitást. Valamint szignifikáns különbség van az egyes táptalajok között (MRS, TSYE) is, ahol az MRS-en jelentősen több antimikrobiális gátló komponens képződött. Míg a szaporodás anaerob illetve aerob körülménye nem befolyásolta szignifikánsan a termelt gátló komponenseket.



27.ábra: Gátlás az *E. coli*-val szemben töményített és liofilizált felülúszóval (Forrás: saját munka)

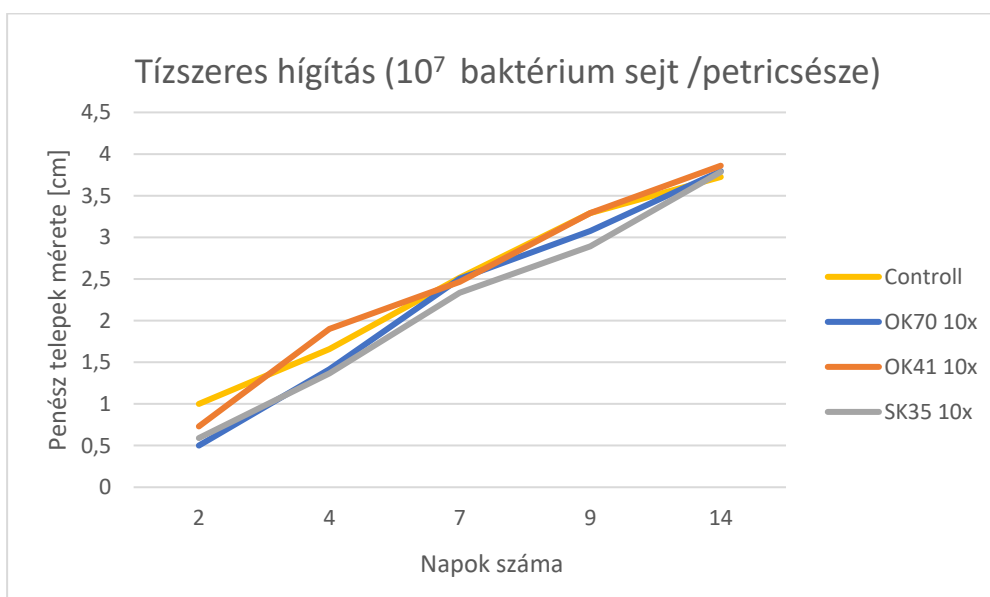
² OK70MRSA^e: az OK70-es törzs felülúszója MRS-en, aerob körülmények között szaporítva, OK70MRSAⁿ: az OK70-es törzs felülúszója MRS-en, anaerob körülmények között szaporítva, SK35MRSA^e: az SK35-ös törzs felülúszója MRS-en, aerob körülmények között szaporítva, SK35MRSAⁿ: az SK35-ös törzs felülúszója MRS-en, anaerob körülmények között szaporítva, OK70TSYEA^e: az OK70-es törzs felülúszója TSYE-on, aerob körülmények között szaporítva, OK70TSYEAⁿ: az OK70-es törzs felülúszója TSYE-on, anaerob körülmények között szaporítva.

A penész ellen az állatokból izolált tejsav baktériumok töményített felülúszói esetében sem kaptam gátló aktivitást. Az *E. coli* esetében viszont természetesen hatékonyabb gátlást tapasztaltam összességében, mint az eredeti felülúszó vizsgálatának folyamán. Az eredményekről fénykép látható a 27. ábrán. A töményített felülúszók mért eredményeinek statisztikai kiértékelése *E. coli*-ra a 23. táblázatban látható.

4.5. Különböző koncentrációjú tejsavbaktérium sejtek közvetlen hatása az *A. clavatus* penész szaporodására

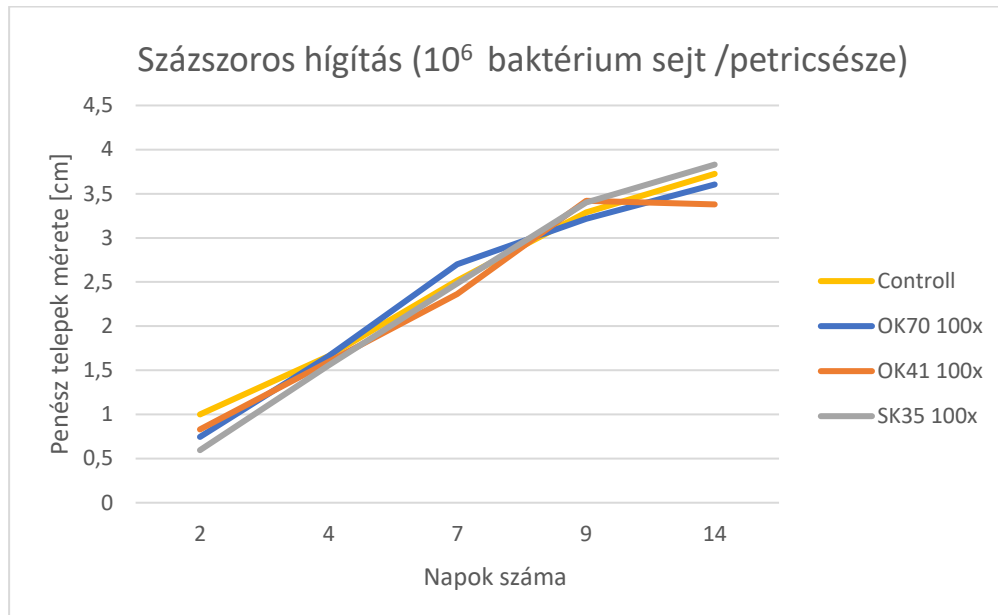
Az összes törzsről elmondható általánosságban, hogy egészen a 9. napig szépen gátolta a penész gombát, az utolsó vizsgálati napon pedig, ami a 14. nap volt, a penész telep mérete alig nőtt. OK41-es törzsnél az egyik 100-szoros (10^6 baktérium/petricsésze) és 10-szeres (10^7 baktérium/petricsésze) hígításnál a 9. napon már nem tapasztaltam a penész-telep növekedését. A 32. ábrán látható néhány példa a második napi tenyészetekről.

- Tízszeres hígítás eredményeiből azt láthatjuk (28. ábra), hogy ennél a hígításnál az az *Enterococcus faecalis*, OK41 törzs-nek volt a leghatékonyabb a gátlása, de kiugró értékek nem tapasztalhatóak egyik törzs esetében sem. A 14. napon már szinte egybe esik az összes penésztelep mérete.



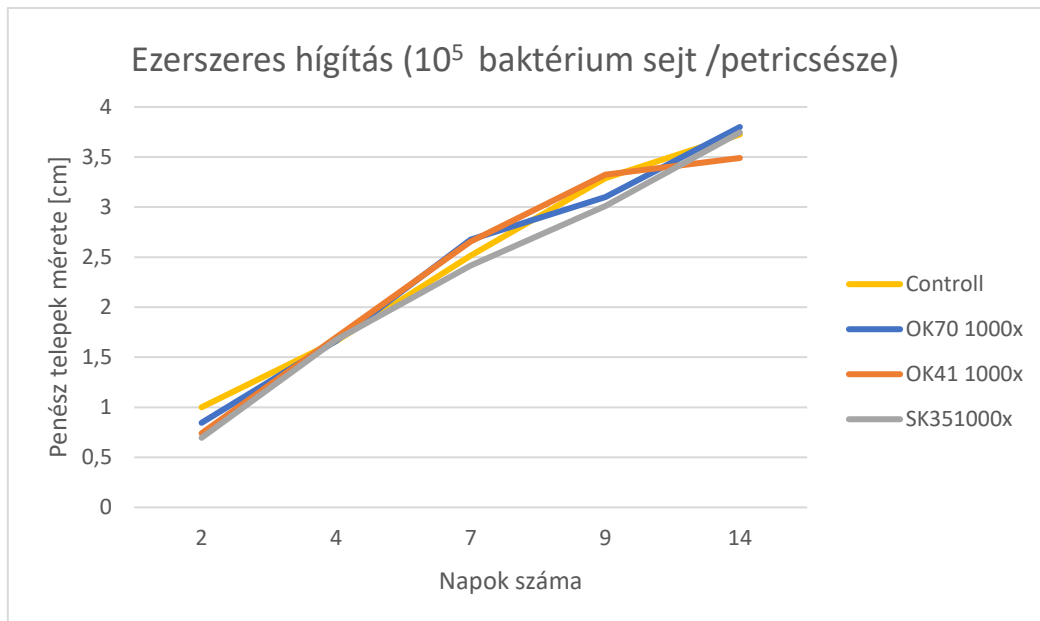
28.ábra: Közvetlen gátlás eredményei tízszeres hígítással *Aspergillus clavatus* ellen. (Forrás: saját munka)

- Százszoros hígítás eredményi a következőképpen alakultak az *Enterococcus faecalis*-OK70 törzs részéről: a 7.napig nőtt a telepek mérete, a 7. nap után a növekedést folyamatos csökkenés jellemezte. Az *Enterococcus hirae* SK35 esetén ezzel szemben, pedig pont, hogy a napok előrehaladtával nőtt a penésztelep mérete (29.ábra).



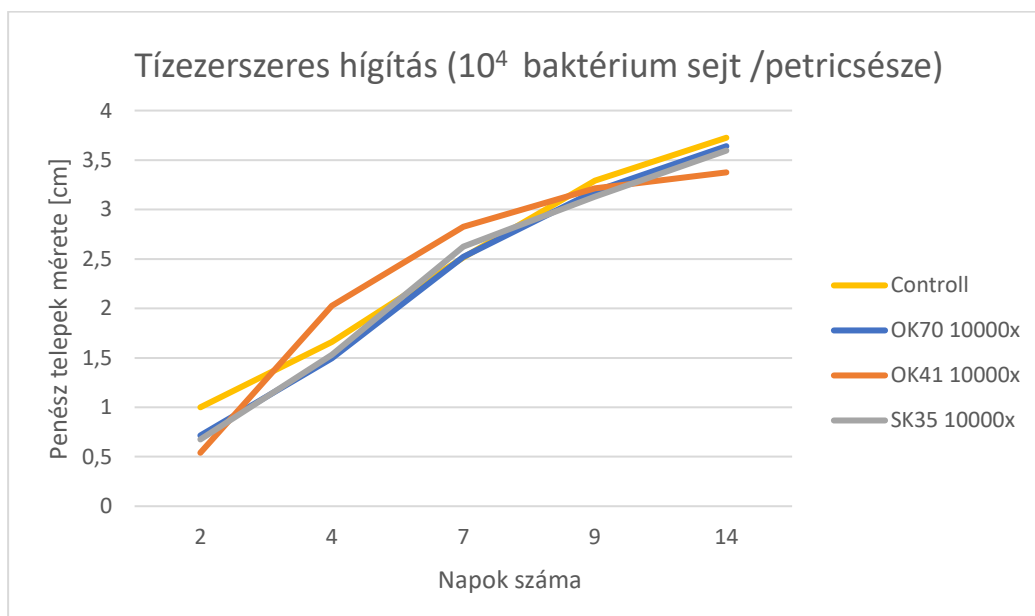
29.ábra: A közvetlen gátlás eredményei százszoros hígítással *Aspergillus calavatus* ellen.
(Forrás: saját munka)

- Az ezerszeres hígításnál, azt tapasztalhatjuk, hogy a 2. és 4. napon egymással párhuzamosan nőttek a penésztelepek méretei. Az SK35 törzs egyik mintája esetén a penésztelep mérete viszont a 4. nap letelte után ellépett a többi törzstől, majd az OK70-es törzs esetén csökkent a növekedés, a 9. nap után viszont újra növekedést tapasztalhattunk. A többi törzs egymással párhuzamosan gátolt tovább. Az eredmények a 30. ábráról olvashatóak le.

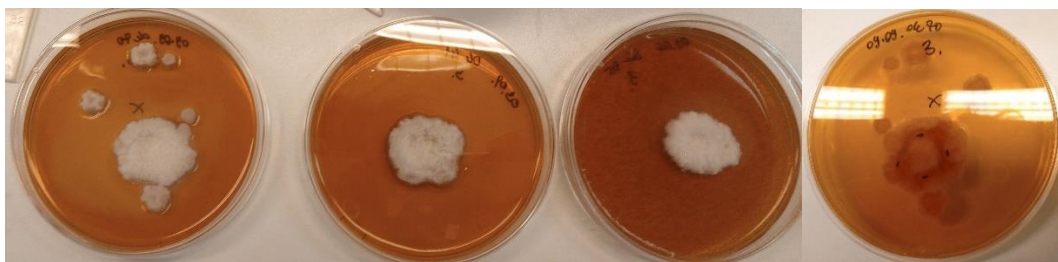


30.ábra: A közvetlen gátlás eredményei ezerszeres hígítással *Aspergillus calavatus* ellen.
(Forrás: saját munka)

- A 31. ábrán láthatóak a tízezerszeresen hígított baktériumok eredményei, az OK41-es törzs első mintájának penésztelep növekedése jelentősen eltér a többitől, neki a legnagyobb a telepátmérője, majdhogynem végig. Az OK70-es és SK35-ös törzsek esetén nagyjából ugyanazon az értéken mozogtak a telepátmérők.



31.ábra: A közvetlen gátlás eredményei tízezerszeres hígítással *Aspergillus calavatus* ellen.
(Forrás: saját munka)



32.ábra: Gátlás az *Aspergillus clavatus*-szal szemben kétrétegű agar módszerrel (1.napos tenyészet) (Forrás: saját munka)

4.6. Fehérjebontó enzimés kezelés hatása a gátló aktivitásra

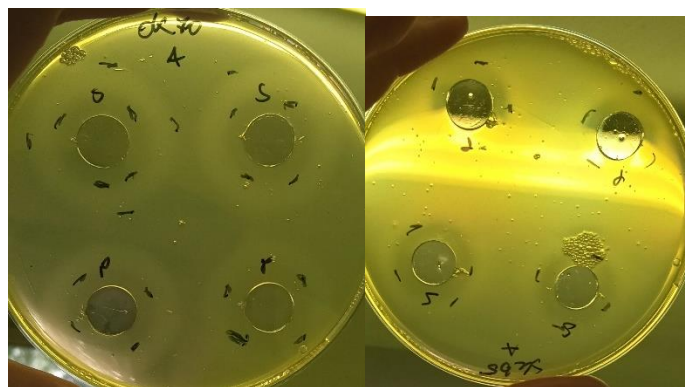
Az eredményekből látszik, az SK35-ös törzsnél nincs szignifikáns különbség az aerob, az anaerob, a pepszinnel kezelt és az eredeti felülúszó gátlási aktivitása között (24., 25. táblázat). A fehérjebontó enzimmel történő kezelésnek nem volt jelentős hatása a gátlás mértékére, amiből megállapítható, hogy a gátló komponens nem fehérje-jellegű. A gátlásra példa látható a 33.ábrán.

	SK35		OK70	
	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob
Eredeti	0,44	0,465	0,395	0,435
Pepszines	0,42	0,53	0,42	0,365

24.táblázat: A pepszinnel kezelt és nem kezelt felülúszók gátlási zónáinak (cm) átlaga (Forrás: saját munka)

	SK35		OK70	
	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob
Eredeti	0,014142	0,106066	0,007071	0,007071
Pepszines	0,014142	0,056569	0,056569	0,035355

25.táblázat: A pepszinnel kezelt és nem kezelt felülúszók gátlási zónáinak (cm) szórása (Forrás: saját munka)



33.ábra: Gátlási zónák pepszinnel kezelt és enzimmel nem kezelt felülúszókkal *E. coli*-val szemben. (Forrás: saját munka)

4.7. Felülúszók sejtmembrán permeabilitásra kifejtett hatása

Mivel az olyan gátló anyagok, mint pl. a bakteriocinek a sejtmembrán permeabilitását változtatják meg, illetve a szerves savak disszociálatlan molekulái is a hatással vannak a membrán permeabilitására [Alakomi et al., 2000], kísérletem során arra kerestem a választ, hogy a sejtmentes felülúszóban található gátló anyagok milyen hatással van az *E. coli* sejtmembránjának permeabilitására.

Ehhez vizsgáltam az *E. coli*-ból kiáramló 260 és 280 nm-es UV-abszorbens anyagokat, ami a membránok megváltozására utal [El-Nakeeb et al., 2011].

Az eredmények azt mutatták, hogy az alkalmazott felülúszó mennyisége, aránya (1:1) a sejtszuszpenzióhoz képest, illetve az alkalmazott kezelési idő esetén nem volt kimutatható változás a 260 és 280 nm-en mért abszorbancia értékekben, ezáltal az *E. coli* sejtmembránjának permeabilitásában. Egyedül az *E. coli* fiziológias sóoldattal történő kezelése során változtak az abszorbanciák, csökkenő irányban.

5. Következtetések és javaslatok

A vizsgált 41, állatkerti állatból izolált tejsavbaktérium között számos olyan törzset találtam, amelyik jó antimikrobiális tulajdonságot mutatott a vizsgált penész, illetve baktériummal szemben, azonban egyik sem rendelkezett olyan általánosan jó antimikrobiális tulajdonsággal, ami széles körben alkalmazhatóvá tenné. Azonban az elmondható, hogy a legjobb antimikrobiális aktivitást az *Enterococcus* nemzetségből származó három törzs mutatta.

Azok az anyag/anyagok, amiket a tejsavbaktériumok termeltek, kísérleteimben bebizonyosodott, hogy nem voltak gátló hatással az *Aspergillus clavatus*-szal szemben, hiszen a baktériumok csak jelenlétükben gátolták az *Aspergillus clavatus*-t, a felülúszó ellenben nem. Az *Escherichia coli* esetében a gátló hatást okozó termékek a felülúszóban találhatóak, minden kísérlet során akadt olyan tejsavbaktérium a szelektált négy törzs közül, amelyik szép gátlási zónát alakított ki, egyedül a pH beállított felülúszóknál nem alakult ki gátlási zóna, ami arra utal, hogy a savhatás befolyásolja a gátlási képességet és nem fehérje jellegű a gátló komponens. A *Torulaspora delbrueckii*-t egyik tejsavbaktérium által termelt komponens sem volt képes gátolni.

A felülúszó pH értéke (SK35MRSA: 3,83, OK70MRSA: 4,34) és gátló aktivitásának (SK35MRSA: 0,425 cm; OK70MRSA: 0,325 cm) mértéke között összefüggés van, ami a gátló komponens pH függésére, valószínűleg a termelt savak mennyiségére és milyenségére utal.

Mindenképpen javasolnám a szelektált, jó gátló hatással rendelkező törzsek által termelt komponensek behatóbb vizsgálatát. Az eredmények alapján a következő kísérleteket végezném még el:

- HPLC segítségével azonosítanám a tejsavbaktériumok által termelt komponenseket.
- Széleskörűbb gátló aktivitás vizsgálatot végeznék több mikroorganizmussal szemben
- Penész esetében a meghatározott komponensekre nézve, újra elvégezném a vizsgálatot, csak specifikusan vizsgálnám a gátló hatást, hiszen itt már ismerném a tejsavbaktériumok által termelt termékeket és azoknak a koncentrációját.

Vizsgálataimba bevont, különböző állatokból izolált tejsavbaktériumok gátló hatását eddig csak penészgombákra vizsgálták, baktériumra és élesztőre kifejtett hatásukat eddig még nem kutatták, ezért vizsgálataim egyedülállóak és eredményeim új tudományos jelleggel bírnak.

6. Összefoglalás

A kísérleteim arra irányultak, hogy megnézzem az állatkerti állatokból származó tejsavbaktériumok hogyan hatnak az *Aspergillus clavatus*, *Escherichia coli* és a *Torulaspora delbrueckii* mikroorganizmusokra, megvizsgáljam a különböző tejsavbaktériumok antimikrobiális hatásait

A kísérletek első felében, 40 tejsavbaktériumot próbáltam feléleszteni és elszaporítani, amiket random módon, véletlenszerűen választottam ki, majd megvizsgáltam az *Aspergillus clavatus*-al, *Escherichia coli*-al és a *Torulaspora delbrueckii*-vel szemben, fejtenek-e ki valamilyen antimikrobiális hatást amivel tudják gátolni valamelyik mikroorganizmus szaporodását.

A kísérleteim második felében 4, legjobb gátló aktivitással rendelkező mikroorganizmust kiválasztottam további kísérletekre egy hőtéskép segítségével, amelyek a következők voltak: SK35: *Enterococcus hirae*; OK70: *Enterococcus faecalis*; OK41: *Enterococcus faecalis*; OR79: *Lactobacillus sakei*. A kiválasztott tejsavbaktériumokat két különböző táptalajon (TSYE, MRS), aerob és anaerob környezetben is elszaporítottam, hogy megnézzem, hogy a tápközegek illetve a környezet befolyásolja-e az antimikrobiális hatást. Többféle vizsgálatot is végeztem, hogy megnézzem pontosan mi okozza az antimikrobiális hatást. Első lépésként sejtmentes felülúszót készítettem, egy 10 perces 80°C-os vízfürdőbe helyeztem őket utána a felülúszókat leszűrtem 0,22 µm-es fecskendőszűrőn. Megmértem az összes mintának a pH-ját és beállítottam 6,8-7 közötti pH értékre. Az eredeti és pH beállított felülúszók gátló hatását agar-lyuk diffúziós módszerrel mértem. Liofilizáltam a felülúszókat és töményítettem, hogy megnézzem így is a tejsavbaktériumok felülúszóinak antimikrobiális hatását. A tejsavbaktériumok közvetlen gátló aktivitását is megvizsgáltam penészre egy külön kísérletben, amelynek során négy különböző hígítást készítettem (10x-es; 100x-os; 1000x-es; 10000x-es), a vizsgálatot kétrétegű agar módszerrel végeztem el. A penésztelepek méretét lemértem második, negyedik, hetedik, kilencedik és a tizennegyedik napon is. Végeztem egy fehérjebontó enzim kezelését is a felülúszókon, hogy megnézzem, hogyan hat a gátló aktivitásra, ezt a vizsgálatot már csak *E. coli*-val végeztem el, mert a tejsavbaktériumok által termelt komponensekkel szemben a legnagyobb érzékenységet ez a mikroba mutatta. Az

enzimes kezelést pepszinnel végeztem, a gátló aktivitást agar-lyuk diffúziós módszerrel mértem. Az utolsó vizsgálat során, sejtmembrán-permeabilitás vizsgálatot hajtottam végre, ahol az *E. coli*-ból kiáramló 260 és 280 nm-es UV-abszorbens anyagokat mértem, ami a membránok megváltozására utal.

A penésszel kapcsolatos eredmények azt mutatták, hogy a tejsavbaktériumok nem a felülúszóba választották ki az antifungális gátló anyagot, hanem közvetlenül fejtették ki a gátló hatásuk. Ezzel szemben a baktériummal szembeni gátló aktivitás a felülúszóban mutatkozott és az eredmények alapján következtethetünk arra, hogy a sav hatás, a termelt savak mennyisége és milyensége az, ami befolyásolja az antimikrobiális hatást.

7. Irodalomjegyzék

- Aizawa S-I. (2014) - Chapter 10 - *Escherichia coli* — The Representative of the Gram-Negative Bacteria - The Flagellar World - Academic Press
- Alakomi H.-L., Skyttä E. , Saarela M., Mattila-Sandholm T. , Latva-Kala K., Helander I.M. (2000) - Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane - Appl Environ Microbiol 66.
- Bangar S.P., Suri S., Tiff M., Ozogul F. (2022) - Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach - Food Bioscience – Elsevier
- Basso R.F., Alcarde An.R., Potugal C.B. (2016) - Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? - Food Research International - Elsevier
- Baye K., Guyot J.-P., Mouquet-Rivier C. (2017) – The unresolved role of dietary fibers on mineral absorption – Critical Reviews In Food Science and Nutrition - Pubmed
- Campaignello D., Sinigaglia M. (2017) - Chapter 10 - Wine Spoiling Phenomena - The Microbiological Quality of Food - Woodhead Publishing
- Cerdó T., Garcia-Santos J.A., Bermúdez M.G., Campoy C. (2019) – The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity – MDPI: Nutrients – 10.3390/nu11030635
- Corsetti , Gobbetti M. (2002) - *LACTOBACILLUS* SPP. | *Lactobacillus plantarum* -
- Darby T.M., Jones R.M. (2017) - Chapter 10 - Beneficial Influences of *Lactobacillus plantarum* on Human Health and Disease - The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology - Academic Press
- De Angelis M. , Gobbetti M. (2016) - *Lactobacillus* SPP.: General Characteristics - Reference Module in Food Science

- De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. (1960)- A medium for the cultivation of lactobacilli -Journal Of Applied Bacteriology - 23:1,130-135.
- de Siqueira L.B. de O., Matos A.P. dos S, de Silva M.R.M., Pinto S.R., Santos-Oliveira R. (2022) - Pharmaceutical nanotechnology applied to phthalocyanines for the promotion of antimicrobial photodynamic therapy: A literature review - Photodiagnosis and Photodynamic Therapy - Elsevier
- Dodd D., Spitzer M.H., Van Treuren W., Merrill B.D., Hryckowian A.J., Higginbottom S.K., Le A., Cowan T.M., Nolan G.P., Fischbach M.A., Sonnenburg J. L. (2017) – A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites – Nature – 551, 648-652
- Dubreuil J.D. (2014) - *ESCHERICHIA COLI* | Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) - Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) – Elsevier
- Ebrahimi M., Khomeiri M., Masoudi-Nejad A., Sadeghi A, Sadeghi B., Kashaninejad M. (2017) - Inhibitory effects of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods against aflatoxigenic *Aspergillus spp.* - Comparative Clinical Pathology – Springer Nature Link
- EL Ghany K.A., Elhafez E.A., Hamouda R.A., Mahrous H., Ahmed F.A.H., Hamza H.A. (2014) – Evaluation of Antioxidant and Antitumor Activities of *Lactobacillus acidophilus* Bacteria Isolated from Egyptian Infants – International Journal of Pharmacology
- El-Nakeeb M.A., Abou-Shleib H.M., Khalil A.M., Omar H.G., El-Halfawy O.M. (2011) - Membrane permeability alteration of some bacterial clinical isolates by selected antihistaminics - Braz J Microbiol - 42(3):992-1000. doi: 10.1590/S1517-838220110003000019.

Encyclopedia of Dairy Sciences – Elsevier

- Even S., Lindley N., Loubière P., Cossu-Bousquet M. (2002) - Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints - Mol. Microbiol. 45 1143–1152. 10.1046/j.1365-2958.2002.03086.x

- Farsimadan M., Motamedifar M. (2020) - Bacterial infection of the male reproductive system causing infertility - Journal of Reproductive Immunology - Elsevier
- Feiner G. (2006) - 39 - The microbiology of specific bacteria - Meat Products Handbook – Woodhead Publishing
- Fijan S. (2014) - Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature - International Journal of Environmental Research and Public Health
- Fusco V., Abriouel H., Benomar N., Kabisch J., Chieffi D., Gyu-Sung C. , Franz C.M.A.P. (2018) - Chapter 10 - Opportunistic Food-Borne Pathogens - Food Safety and Preservation
- Gibson T., Abdel-Malek Y. (2009) – The formation of carbon dioxide by lactic acidbacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process – Cambridge University Press
- Gil-Sánchez, Suáldea B. B., Moreno-Arribas M.V. (2019) - Chapter 6 - Malolactic Fermentation - Red Wine Technology – Academic Press
- Hammes W.P., Hertel C. (2002) - Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook - Food Research International - Elsevier
- Hardy H., Harris J., Lyon E., Beal J., Foey A.D. (2013) - Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology – MDPI: Nutrients
- Harrison M.A., Albanese Jr. J.B. (2019) – Beer/Brewing – Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition) – Elsevier
- Hellborg, Piskur J. (2009) - 7 - Yeast Diversity in the Brewing Industry - Beer in Health and Disease Prevention - Academic Press
- Hocking A.D. (2006) - *Aspergillus* and related teleomorphs - Food Spoilage Microorganisms - Woodhead Publishing
- Holland R., Crow V., Curry B. (2011) - Lactic Acid Bacteria | *Pediococcus spp.* - Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition) - Academic Press

- Ibrahim S.A. (2016) - Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species - Reference Module in Food Science
- Indira M., Venkateswarulu T.C., Peele K. A., Bobby Md.N, Krupanidhi S. (2019)- Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: a review – Springer Link - 306. doi: 10.1007/s13205-019-1841-2
- Kamaluddin W.N.F.W.M., Rismayuddin N.A.R., Ismail A.F., Aidid E.M., Othman N., Mohamed N.A.H., Arzmi M.H. (2020) - Probiotic inhibits oral carcinogenesis: A systematic review and meta-analysis - Archives of Oral Biology - Elsevier
- Kashyap D.R. (2019) – Microbial Metabolites: Peptides of Diverse Structure and Function – New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering – Elsevier
- Kieliszek M., Kot A.M., Bzducha-Wróbel A., Błazejak S., Gientka I., Kurcz A. (2017) - Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review - Fungal Biology Reviews – Elsevier
- Kurtzman C.P. (2011) - Chapter 75 – *Torulaspora* - The Yeasts (Fifth Edition) - Elsevier
- LeBlanc J.G., Chain F., Martín R., Bermúdez- Humarán L.G., Courau S., Langelia P. (2017) - Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria – Microbial Sell Factories – Springer Nature Link
- Lingling Z. , Kaiqi L. , Mengting W., Xueyi J. , Yuanchen Z. , Jinling C. (2022) - The antimicrobial effect of a novel peptide LL-1 on *Escherichia coli* by increasing membrane permeability – BMC Microbiology
- Lonvaud-Funel A. (2001) - Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria - FEMS Microbiology Letters - 199 9–13. 10.1111
- Lonvaud-Funel A. (2014) - Leuconostocaceae Family - Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) - Elsevier
- Lorenzo J.M., Munekata P.E., Dominguez R., Pateiro M., Saraiva J.A. , Franco D. (2018) - Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability:

General Aspects and Overall Description - Innovative Technologies for Food Preservation - Academic Press

- Masami M. , Norikatsu Y. , Yukiko K. , Akira K., Tomoko S. , Koichi W. , Teruhiko Y. (2002) - *Lactobacillus equi* sp. nov., a predominant intestinal *Lactobacillus* species of the horse isolated from faeces of healthy horses - International journal of systematic and evolutionary microbiology - 52(Pt 1):211-214. doi: 10.1099/00207713-52-1-211.
- Min-Kyung J. , Xiaoyang M. , Jong-Wook Y. , Yoon-Jung S. , Hyo-Jong K., Dong-Hyun K. (2023) - Patient-derived *Enterococcus mundtii* and its capsular polysaccharides cause depression through the downregulation of NF-κB-involved serotonin and BDNF expression - Microbes and Infection - Elsevier
- Montalto M., Curigliano V., Santoro L., Vastola M., Cammarota G., Manna R., Gasbarrini A., Gasbarrini G. (2006) – Management and treatment of lactose malabsorption - World Journal of Gastroenterology
- Monticelli J., Knezevich A., Luzzati R., Di Bella S. (2018) - Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens* - Journal of Infection and Chemotherapy – Elsevier
- Mukherjee S., Joardar N., Sengupta S., Babu S.P.S. (2018) - Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases: Lessons from recent findings - The Journal of nutritional biochemistry
- Narvhus J.A., Axelsson L. (2003) - LACTIC ACID BACTERIA - Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)
- Nawaz F., Khan M.N., Javed A., Ahmed I., Ali N., Ali M.I., Bakhtiar S.M., Imran M. (2019) - Genomic and Functional Characterization of *Enterococcus mundtii* QAUEM2808, Isolated From Artisanal Fermented Milk Product Dahi - Sec. Food Microbiology - Frontiers
- Nitschke M. , Costa S.G.V.A.O. (2007) - Biosurfactants in food industry - Trends in Food Science & Technology – Elsevier

- Patel S., Goyal A. (2012) – The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review – 3Biotech – Springer Nature Link
- Prescott J.F., Sykes J.E., Daniels J.B. (2021) - 50 - Streptococcal and Enterococcal Infections - Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat (Fifth Edition) – Elsevier
- Rowland I., Gibson G., Heinken A., Scott K., Swann J., Thiele I., Tuohy K. (2017) – Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components - European Journal of Nutrition - Springer Nature Link
- Said H.M. (2011) - Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease - Biochemical Journal
- Santos H.M., Ching-Yi T. , Catulin G.E.M. , Trangia K.C.G., Tayo L.L., Hung-Jen L. , Chuang K.P. (2020) - Common bacterial, viral, and parasitic diseases in pigeons (*Columba livia*): A review of diagnostic and treatment strategies- Veterinary Microbiology
- Teixeira P. (2014) - *LACTOBACILLUS* | *Lactobacillus brevis* - Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) – Elsevier
- Thursby E., Juge N. (2017) – Introduction to the human gut microbiota – Biochemical Journal – 474 1823-1836
- Tomás M.S. J., Otero M.C., Ocana V., Nader-Macías M.E. (2004) - Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide – Springer Link- 268:337-46. doi: 10.1385/1-59259-766-1:337.
- Wiertsema S.P., van Bergenhenegouwen J., Garssen J., Knippen L.M.J. (2021) - The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of Infectious Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies – MDPI : Nutrients
- Yaqi W. , Jiangtao W. , Mengxin L. , Zhen S. , Meluleki H. , Jinju W. , Xiaojia B. , Jingli X. , Yanping W. , Weitao G. (2021) - Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry - Frontiers in bioengineering and biotechnology - 12;9:612285.
- Zacharof M.P. , Lovitt R.W. (2012) - Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article - APCBEE Procedia - Elsevier

- Zhaolai D., Zhenlong W., Suqin H. , Weiyun Z. , Guoyao W. , (2015) – Amino acid metabolism in intestinal bacteria and its potential implications for mammalian reproduction – Molecular Human Reproduction – Oxford Academic

Internetes források

Internet 1. : <https://www.dovepress.com/a-case-of-weissella-confusa-isolated-from-blood-of-a-patient-with-coro-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>

Internet 2. : <https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-positive-cocci/diplococci/catalase-negative-1/growth-on-mcconkey-agar-without-salt/pyrase-positive-3/enterococcus-casseliflavus.html>

Internet 3. : https://www.researchgate.net/figure/Microscopic-View-1000X-of-Escherichia-coli_fig4_274080438

Internet 4. : <https://www.flickr.com/photos/142417642@N02/27870264793>

Internet 5. : <https://eurekabrewing.wordpress.com/2014/02/10/hello-my-name-is-torulaspota-delbrueckii/>

Internet 6. : <https://madarinfo.hu/a-sisakos-kazuar-casuarius-casuarius-megjelenese-életmodja-szaporodása/>

Internet 7. : <https://bioparcvalencia.es/en/welfare/mhorr%27s-gazelle/>

Internet 8. : <https://www.brilliant-creation.org/land-dwellers/mammals/western-grey-kangaroo/>

Internet 9. : <https://www.pbs.org/wnet/nature/blog/aldabra-tortoise-fact-sheet/>

Internet 10. : <https://ujnepszabadsag.com/2020/01/30/csupasz-turkalo-az-emberiseg-ajandeka/>

Internet 11. : <https://ng.24.hu/termeszettudomany/2022/12/11/uj-lepes-az-eszaki-szelesszaju-orrszarvu-megmenteseert/>

Internet 12. : https://hu.wikipedia.org/wiki/V%C3%B6r%C3%B6s_macskamedve

Internet 13. : <https://berek.hu/2020/11/21/tarajos-sul/>

Internet

14.:

https://tevhitoszlata.blog.hu/2022/01/15/a_tevok_vizet_tarolnak_a_pupjukban

Internet 15. : <https://sokszinuvidek.24.hu/mozaik/2020/08/29/korrekord-gazella-mhorr-gazella/>

NYILATKOZAT

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

A hallgató neve: Hesz Mónika

A Hallgató Neptun kódja: E73L55

A dolgozat címe: Egzotikus állatokból származó tejsavbaktériumok antimikrobiális komponenseinek vizsgálata

A megjelenés éve: 2024

A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

A konzulens tanszékének a neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

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

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

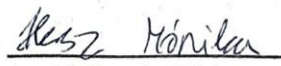
A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

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

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumába. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumában.

Kelt: 2024. év 11. hó 01. nap


Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

NYILATKOZAT

Hesz Mónika (hallgató Neptun azonosítója: **E73L55**) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: Budapest, 2024. év október hó 30. nap



Dr. Zsolt Zsolt
belső konzulens

¹ A megfelelő alá húzandó.

² A megfelelő alá húzandó.