

DIPLOMADOLGOZAT

Schreiner Lilla

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Budai Campus
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszerbiztonsági és -minőségi mérnöki
mesterképzési szak

Szájüreg eredetű baktériumok biofilm képzése modell
felületeken és fém ivópalackban

Belső konzulens: Taczmanné dr. Brückner Andrea
egyetemi docens

Belső konzulens
intézete/tanszéke: Élelmiszer-mikrobiológia, -
higiénia és -biztonság Tanszék

Készítette: Schreiner Lilla

Budapest
2024

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	1
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Az újrafelhasználható ivópalackok jelentősége	3
2.2. Az újrafelhasználható palackok mikrobiológiája	6
2.3. A biofilmek	10
2.3.1. Biofilmek előfordulása különböző felületeken	12
2.4. A száj mikrobiótája	14
2.5. A vizsgált baktériumok tulajdonságai és biofilmképző képessége	17
2.5.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
2.5.2. <i>Klebsiella oxytoca</i>	19
2.5.3. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20
2.5.4. <i>Pseudomonas putida</i>	23
2.5.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.5.6. <i>Acidovorax delafieldii</i>	26
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
3.1. A vizsgálatokhoz használt tenyészetek	28
3.2. A vizsgálatokhoz használt tápközegek	28
3.3. Mikroorganizmusok azonosítása különböző személyektől származó palackokról	29
3.4. Biofilmképzés vizsgálata modell lemezeken	29
3.5. Palack belső felületén képződő biofilm és eltávolíthatóságának vizsgálata	30
3.5.1. A rozsdamentes palackok előkészítése	30
3.5.2. Biofilmképződés vizsgálata rozsdamentes palackban	31
3.5.3. Biofilm eltávolíthatóságának vizsgálata háztartásban alkalmazott tisztítási módszer segítségével	31
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	33
4.1. A palackok szájáról izolált mikroorganizmusok azonosításának eredményei	33
4.2. A biofilmképzés modell felületeken	33
4.3. Biofilmképzés rozsdamentes acél palackban	37
4.4. Tisztítási kísérlet eredményei	39
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	41
6. ÖSSZEFOGLALÁS	44
7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	46
8. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	55
8.1. Ábrák	55
8.2. Táblázatok	56

9. MELLÉKLETEK.....	57
---------------------	----

Schreiner Lilla

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Egy régi gondolatot idézett Szent-Györgyi Albert, amikor is a vizet nem másnak, mint az „élet mátrixának” nevezte (Ball, 2008). A víz ugyanolyan alapvető építőpillére az életnek, mint az oxigén a szárazföldi állat számára. Elmondható, hogy a legtöbb szárazföldi állatnak több, mint 70 tömegszázaléka vízből áll (Arlan, 1992). Az emberi test tekintetében ez pontosabban 50-70% közötti tömegszázalékra tehető. A nők esetében alacsonyabb víztartalommal rendelkezik a szervezetük (50%), férfiak esetében ennél valamennyivel több (60%) (Radó, 2011). Az emberi szervezet számára elengedhetetlen a megfelelő vízbevitel biztosítása.

Az eldobható műanyag vizes palackok (PET) használata nagymértékben hozzájárul a környezetszennyezéshez és a globális felmelegedéshez az utóbbi évtizedekben. A már kiürített palackok jobb esetben a hulladékgyűjtőkbe kerülnek, rosszabb esetben kommunális hulladéktárolókba, amellyel a palack élettartama csak a benne levő folyadék elfogyasztásáig tart. Ezek együttesen vezettek ahhoz a kampányhoz, hogy a már felhasznált műanyag palackok újrafelhasználható ivóvízes palackként funkcionáljon (Amadi és munkatársai, 2020). Ezt követően pedig a piacon megjelentek a rozsdamentes acélból, üvegből, különböző műanyagokból (polikarbonát, polipropilén) készült palackok is a környezettudatosabb vásárlók számára.

A környezettudatosság mellett fontos, hogy a víz megfelelő minőségű legyen. A Magyarországon a hatályban levő rendelet szerint csak az minősülhet ivóvíznek, amely nem tartalmazhat olyan meghatározott koncentrációban vagy mennyiségben mikroorganizmust, parazitát, kémiai, fizikai vagy radiológiai anyagot, ami az emberi szervezet számára és egészségre veszélyes potenciális veszélyt (5/2023. (I. 12.) Korm. rendelet). A vízben természetesen előforduló mikroorganizmusok képesek a palackokban planktonikus formában, valamint felületükön biofilm formában túlélni. Azonban a közvetlen palackból való fogyasztás eredményeképpen a szájban előforduló mikroorganizmusok a palack belső felületére kerülhetnek, amelyek akár lehetnek patogén eredetűek is. Emiatt több kérdés is felmerülhet: vajon az újrafelhasználás miatt a szájból származó mikroorganizmus képes megtapadni és biofilmet képezni? Milyen mértékben befolyásolja a palack anyaga a biofilm képződését? A palack időnkénti tisztítása, hogy befolyásolja a biofilmet? Mely tisztítási módszer lehet a leghatékonyabb a módszer?

A fenti kérdések révén választottam diplomamunkám témájául a rozsdamentes palack belső felületén, szájüregből származó baktériumok által kialakított biofilmképződés nyomonkövetését. A vizsgálat célja volt annak megállapítása, hogy a palack belső felületén képes-e az eredetileg a szájból származó mikroorganizmus biofilmet képezni és milyen mértékben képes elszaporodni. A vizsgálat emellett kitért arra is, hogy egy adott tisztítási módszer, hogy befolyásolja a palack belsejében kialakult biofilmet, vagyis milyen mértékben hatékony a biofilm eltávolítására.

A kitűzött céljaimat a következő módszerekkel és kísérletekkel kívántam elérni:

- 12 darab palack (melynek tartalmát korábban közvetlenül a palackból itták ki különböző személyek) szájáról mintatamponnal vett minta kitenyésztése szájüregből származó mikroorganizmusok izolálása érdekében
- A kitenyésztett ismeretlen mikroorganizmusok azonosítása MALDI-TOF MS (Mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizáció – repülési idő analizátor) berendezés segítségével.
- Az azonosított mikroorganizmusok közül, szakirodalmi kutatás alapján kiválasztani azokat, amelyek biofilmet tudnak képezni.
- A kiválasztott mikrobák biofilm képzésének nyomon követése modell rozsdamentes acél -és polipropilén felületen.
- Az izolált mikrobák és korábban hasonló kísérlethez használt *Pseudomonas aeruginosa*, *Acidovorax delafieldii* biofilm képzésének a nyomon követése és összehasonlítása kereskedelembe kapható rozsdamentes acél palacknak a belsejében.
- Tisztítási módszerek hatékonysága a biofilmmel szemben
- A rozsdamentes acél palackok biofilmképződés eredményeinek összehasonlítása más kutatásokból származó műanyag palackokkal végzett vizsgálatok eredményeivel.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az újrafelhasználható ivópalackok jelentősége

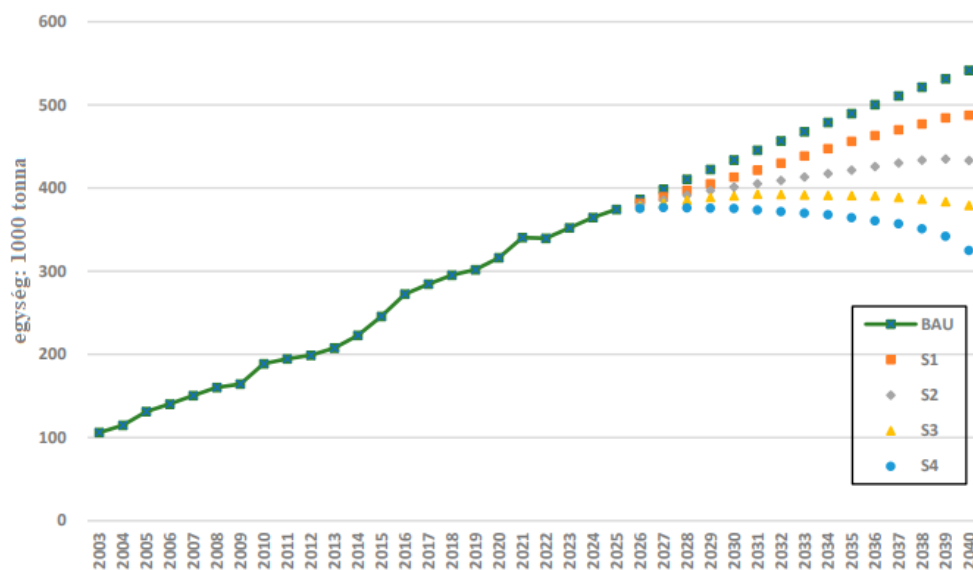
A palackozott víznek az előállítása és fogyasztása hozzájárul olyan súlyos problémákhoz, mint például az éghajlatváltozás, vízszennyezés és az aszályok. Ezáltal egyre nagyobb jelentőségű globális problémává fokozódik. Egy liter palackozott víz előállításához átlagosan 3 liter vizet használnak fel. Továbbá a palackozott vizek előállításához több, mint 1000-2000 -szer több energiára van szükség a csapvíz előállításához képest (Geerts et al., 2020), amivel a hétköznapi fogyasztók valószínűleg nem voltak (esetleg jelenleg sincsenek) tisztában.

A csomagolás anyagát tekintve az eldobható palackok polietilén-tereftalátból (PET) készülnek (Benavides et al., 2018). Ez a műanyag erős és tartós kémiaiilag, valamint rendkívül hőstabil. A gázeresztőképesége alacsony, továbbá könnyen feldolgozható és kezelhető. Ezeknek a tulajdonságoknak köszönhetően szinte egyedülálló kombinációja teszi a PET-et nagyon keresett anyaggá. Ez a stabilitás járul hozzá ahhoz, hogy rendkívül ellenálló a környezeti biológiai lebomlással szemben is. A természetben körülbelül 500 évig is eltarthat, míg lebomlik. Különösen látványos a felhalmozódása a tengeri, szárazföldi területeken (Orset et al., 2017). Ez pedig az ott őshonos/élő állatok életkörülményeit veszélyeztetni, mert a többi szeméttel együtt élelemnek gondolják és elfogyasztják, amely az állat elpusztulásához vezethet.

A globális műanyagtermelés 2022-ben elérte a 400,3 millió tonnát, ami több mint 200-szorosa az 1950-es 1,5 millió tonnának. Európára lebontva 2021-ben a műanyag termelés 57,2 millió tonna volt. A műanyag csomagolóanyagok közül a PET (polietilén-tereftalát) az egyik legfontosabb anyag az ivópalackok gyártásához. Az 1. ábrán a PET palackok iránti igényének megbecsülése látható 2040-ig. 2022-ben 328 ezer tonna PET palackot értékesítettek. A BAU (Business-as-usual scenario) - mely azt vizsgálja, hogy a népesség, a gazdaság, a technológia és az emberi viselkedés jelenlegi tendenciáinak folytatódása milyen következményekkel jár - szerint a palackok iránti igény folyamatosan növekedni fog. A becslések szerint elérheti a 434 ezer tonnát 2030-ra, 2040-re akár az 542 ezer tonnát. A pesszimista (S1) és a mérsékelt (S2) forgatókönyv szerint a palackok iránti kereslet ugyan enyhén csökkenni fog a BAU-hoz képest, de továbbra is növekvő tendenciát mutat. Az optimista (S3) forgatókönyv viszonylag állandó tendenciát jelez előre. A legbizakodóbb az S4 forgatókönyv, mely az egyetlen, ami csökkenő tendenciát jelez. Amennyiben ez a tendencia következne be, csökkenne a PET palackok okozta környezetszennyezés (Lee et al., 2024).

1. ábra: A PET palackok várható fogyasztási igénye forgatókönyvenként 2040-ig.

(Forrás: Lee et al., (2024) alapján)



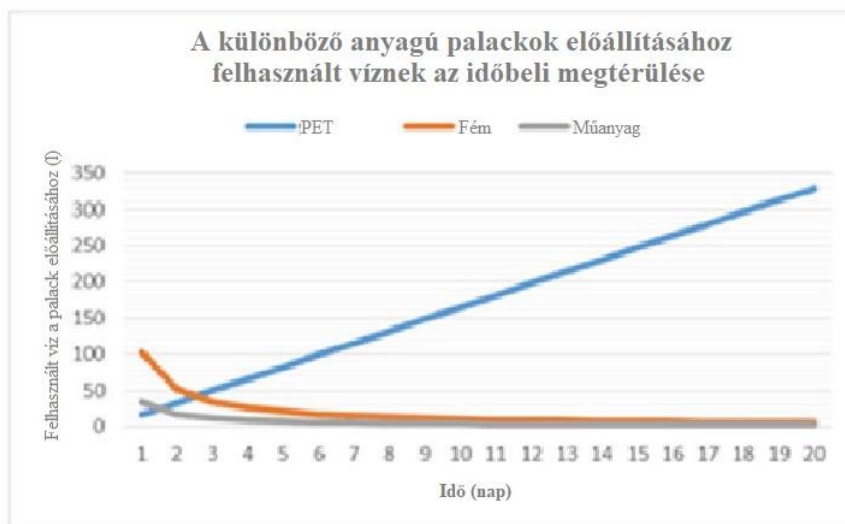
Geerts és munkatársai (2020) megállapították, hogy a csapvíz előnyösebb az erőforrás-hatékonyság szempontjából, mivel különösen nagy környezeti hatással jár a palackok előállítása. Megemlítették ők is, hogy a legtöbb egyszer használatos palack műanyagból, polietilén-tereftalátból készül, amelyet fosszilis tüzelőanyagokból nyernek ki. Hamade és munkatársai (2020) is arról számoltak be, hogy minden egyes percben világszerte megdöbbentő mennyiségű műanyag PET palackot használunk fel. Azonban az újrahasznosított palackok csak a töredékét teszik ki a fenti számoknak, mivel a világ napi mintegy 1 milliárd darabra becsült egyszer használatos PET palackjainak a nagy része nem kerül újrahasznosításra. Siddiqui és munkatársai (2016) megállapították, hogy 2016-ban a globális műanyagtermelés mintegy 11%-a került az édesvízi környezetbe és ez 2030-ra előreláthatóan 53 millió tonnára emelkedik éves szinten.

Mivel a világ növekvő népessége egyre több élelmiszert igényel, ennek eredményeképpen Európában is a csomagolási hulladékok, azaz palackok, dobozok, fóliák növekvő mennyiségéhez vezet. Ennek eredményeképp az Európai Bizottság kötelezi a tagállamokat a hulladékgazdálkodás harmonizálására és a hulladékhierarchia nemzeti szabályozásban történő megvalósítására. Ez azt fejezi ki, hogy a hulladékkeletkezés megelőzését, az újrahasználatot és az anyagában történő újrahasznosítás kell előnyben részesíteni az égetéssel vagy a hulladéklerakással szemben (Simon et al., 2016).

Az Egyesült Államokbeli EPA (Environmental Protection Agency) becslése szerint, ha egy személy minden egyes alkalommal egy liter palackozott víz helyett csapvizet fogyaszt, akkor

évente 0,414 tonna CO₂ felhasználását takarít meg. Ha az egész Egyesült Államokban mindenki így tenne, akkor éves szinten 126 tonna CO₂-t spórolna meg, ami nem kerülne a környezetbe. Ennek érdekében országszerte kampányt indítottak el a környezetbarátabb, újrahasználatos vizes palackok használata érdekében. Az idő előrehaladtával az újrahasználatos palackok környezetvédelmi és gazdasági szempontból is kedvezőbbek. Nem titok viszont, hogy az újrahasználatos vizes palackok előállításához több energiára van szükség. Vegyünk egy 300 grammos rozsdamentes acél palackot példának. Ennek a palacknak az előállítása hétszer több fosszilis tüzelőanyagot igényel, valamint tizennégyszer több üvegházhatású gázt bocsát ki, mint egy normál 32 grammos műanyag palack. A 2. ábra szemlélteti, amennyiben nem egyszer használja az illető, akkor idővel megtérül ez az energiabefektetés. A fém és a műanyag palack előállításához szükség van közel 50-100 liter vízre, azonban, ha naponta használatban van a palack a 10. nap környékén már megtérül az előállításához felhasznált víz. Ellenben a PET palackokkal, ahol is a felhasznált víznek a mennyisége napról napra nő, mivel minden nap új palackból fogyasztják a vizet vagy az adott folyadékot (Chudwick et al., 2013; DiNicolantonio et al., 2022). Ezeknek a palackoknak a használata nagy népszerűségnek örvend a sportolás, iskola, munka vagy utazás közben.

2. ábra: A különböző anyagú palackok előállításához felhasznált víznek az időbeli megtérülése
(Forrás: DiNicolantonio et al., (2022) nyomán)



Napjainkban a környezetbe kerülő eldobható palackok csökkentésének érdekében tehát többféle típusú palack vagy kulacs közül választhatunk. Készülhet például üvegből, fémből (rozsdamentes acél, alumínium), vagy műanyagból (kopoliészter, polietilén, polikarbonát, polipropilén) is. Ezeknek a palackoknak köszönhetően nem csak a környezetnek teszünk jót, de a pénzt is meglehetősen takarítani (Liu és Liu, 2017). Biztonságosabbnak tekinthetőek, mivel ezekből nem tud kioldódni mikroműanyag, mint például a PET palackokból. További előnye

még, hogy ezzel ösztönözve van a vízfogyasztás, így a napi megfelelő mennyiség bevitele a szervezetebe egyszerűbben kivitelezhető, ha mindig magunknál hordjuk a palackot.

Tabaco és munkatársai (2018) összehasonlították a műanyag és rozsdamentes acélból készült palackokat tulajdonságuk szerint. A legideálisabb anyag az élelmiszeriparban a rozsdamentes acél, mivel ez a felület könnyen tisztítható, tartós és nem repedezik, mint más anyagok a műanyag. Ezen felül a rozsdamentes acélból készült tárgyakról ismert, hogy antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkeznek, viszont idővel a palackok a fertőtlenítőszer használata miatt korrodálódhatnak. Ezzel ellentétben a műanyagok porózusabbak és hajlamosak a repedezésre. A repedések kitűnő menedéket szolgáltatnak a mikroorganizmusoknak, hogy megtelepedjenek és elszaporodjanak. A műanyag mellett szól, hogy költséghatékonyabb az előállításuk. Bár az újrahasználatos vizes palackok használata előnyösebb a környezet számára, figyelembe kell venni azt a szempontot is, hogy a felhasználók vajon mennyire következtetnek a higiéniai gyakorlat szempontjából, mennyire ügyelnek a palackok tisztítására és ilyen módon saját egészségükre.

2.2. Az újrafelhasználható palackok mikrobiológiája

Egyre népszerűbbek az újrahasználatos palackok, de a fogyasztók rendszeresen újratöltik a palackokat anélkül, hogy megfelelő figyelmet fordítanak a tisztításukra. Ebből következik az, hogy emiatt a palackok potenciális szennyeződési forrást jelentenek. Tovább fokozza a kockázatot például a palackok rossz kialakítása és az anyaghasználat is. Abban az esetben, ha például a kialakítást jól megoldották, az megkönnyíti a palacknak a megfelelő tisztítását. Ide sorolható a széles palack száj kialakítás, annak érdekében, hogy könnyen hozzáférhető legyen a palack belseje (Sun et al., 2017).

Az újrahasználatos ivóvizes palackok folyamatosan nedvesek és könnyen szennyeződhetnek a felhasználó kezén és száján keresztül. Ennek következtében könnyen megjelenhetnek rajta azok a mikroorganizmusok, amelyek a száj vagy esetleg a bőr normál mikrobiális flórájából származnak. A palack környezete ideális közeget biztosít a baktériumok túléléséhez és elszaporodásához. Ezt tovább fokozza az, hogy általában ezeket a palackokat szobahőmérsékleten (21°C) tároljuk, sőt a nyári időszakban ez a hőmérsékleti érték jóval magasabb lehet, ami még inkább kedvez bizonyos baktériumok szaporodásának (Amadi et al., 2020).

Azokról a felhasználókról, akik használják az újrahasználatos vizes palackokat, általánosságban elmondható, hogy tisztában vannak azzal, hogy a nem megfelelő higiéniai

gyakorlat kockázatot jelenthet, például a baktériumok elszaporodásához vezethet. Nem áll rendelkezésre elegendő információ azonban ahhoz, hogy valóban bebizonyosodjon milyen súlyos egészségügyi veszélyt jelenthet ez, még akkor is, ha a felhasználók általában több hónapig vagy éveken keresztül naponta használják a palackokat (Tabaco et al., 2018; Liu és Liu, 2017). Emellett a felhasználók azt gondolják, hogy elegendő a palackot egyszerűen a mosogatógépbe tenni, pedig ez nem minden esetben megfelelő eljárás. Egyrészt nem minden palack helyezhető mosogatógépbe, másrészt a palack szájának az átmérője nem biztos, hogy megfelelő ahhoz, hogy a víz és a tisztítószer elegendő mennyiségben kerüljön a palack belsejébe, és kifejtsse a hatását a mosogatás során (Sun et al., 2017).

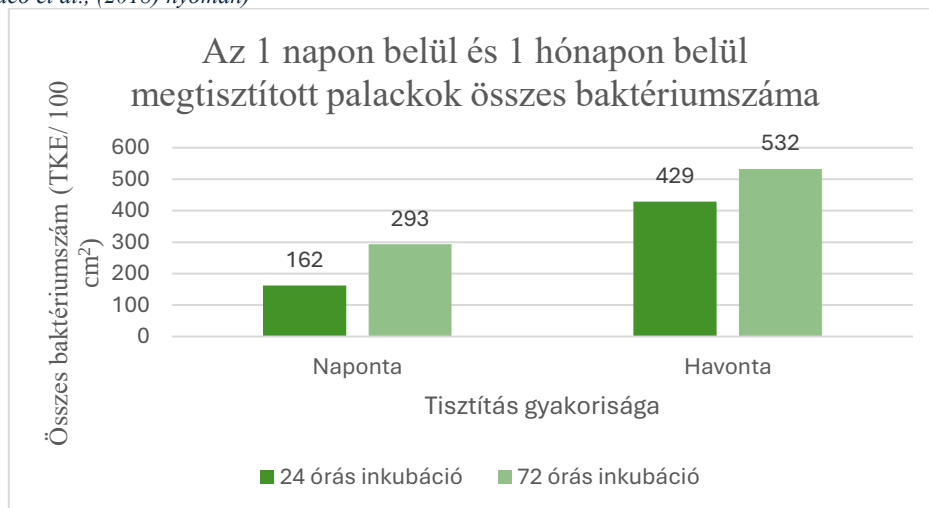
Amadi és munkatársai (2020) szerint a mikroorganizmusok a higiéniai intézkedések, mint például a mosogatószerrel és vízzel történő mosogatás vagy antimikrobális szerrel történő fertőtlenítés esetén is tovább fognak növekedni. Ez ahhoz fog vezetni, hogy felhalmozódnak a palackokban, ami pedig biofilmek kialakulását fogja eredményezni. Ezek a mátrixok, vagyis a biofilmek gátolhatják a fertőtlenítőszer antimikrobális hatását.

Liu és Liu (2017) kísérletet végeztek egy szingapúri gyermekgondozóban. A vizsgálatban 30 - 2 és 7 éves kor közötti - gyerek vett részt, akiknek az újrahasználatos ivóvízes palackjait elemezték a baktériumtartalmukat illetően. A palackok többnyire kopoliészter, polipropilén vagy polietilénből készültek. Megemlítették, hogy Szingapúrban elterjedt ez az újrahasználatos palack, és általában forrált csapvizet használnak az újratöltésükhöz. A tanulmányban megállapították, hogy az aerob heteotróf baktériumtartalom nagyon magas a palackokban ($0 - 2,4 \times 10^5$ TKE/ml), a gyerekek palackjaiban átlagosan $3,4 \times 10^4$ TKE/ml a felnőttekben körülbelül $7,5 \times 10^4$ TKE/ml koncentrációban mutattak ki baktériumokat. A kettő közötti eltérés a palackok kialakításából adódhat. A gyerekek által használt palackok legtöbbször szívószállal ellátott, így kisebb az esélye annak, hogy közvetlenül érintkezik a szájuk a vízzel.

Tabaco és munkatársai (2018) vizsgálatukban a baktérium szaporodást vizsgálták a kísérletben résztvevő alanyok rozsdamentes acél vizespalackjaiban. Tanulmányukban arra is keresték a választ, hogy mégis milyen gyakran kell ezeket a palackokat tisztítani. A felmérésükben 29 alany vett részt, a nemi eloszlás a következő volt: 69% -ban nők és 31% -ban férfiak, akiknek a 97% -a 20-29 év közötti életkorban volt. Az alanyok 52% -a az otthonukból tölti bele a vizet a palack, és körülbelül a 24% -a naponta 1-3 alkalommal tölti újra a palackot. A résztvevők 79% -a csak vízzel tölti meg, néhányan gyümölcslevet és fehérjeport is fogyasztanak belőle. A tisztítási módszereket tekintve a mosogatószeres vizes öblítés a leggyakoribb (69% és a gyakoriságot tekintve a legtöbbször hetente (59%) tisztítják csak a palackot. A 3. ábra a

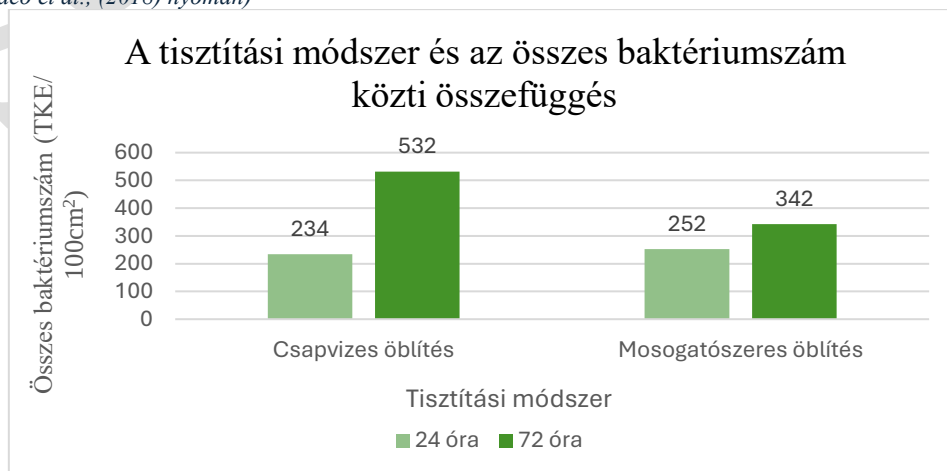
mikrobaszám és a tisztítási gyakoriság közötti összefüggést mutatja be. Huszonnégy órás inkubációt követően a naponta tisztított palackok belső felületéről kimutatott mikrobaszám 162 TKE/100cm², az 1, 2, 3 hetente, vagy csupán havonta tisztított palackok esetén a mikrobaszáma 429 TKE/100cm² volt. A 72 órás inkubáció eredményei is azt tükrözik.

3. ábra: A palack tisztítási gyakoriságának és a palack belső felületének szennyezettsége közötti összefüggés (Forrás: Tabaco et al., (2018) nyomán)



A 4. ábrán a tisztítási módszer és a mikrobaszám közötti összefüggés meglepő eredményt adott: a normál csapvízzel történő öblítés esetén a 24 órás inkubáció után 234 TKE/100cm², míg a mosogatószeres vizes esetén 252 TKE/100cm² volt. Ebben az esetben a mosogatószeres tisztítás semennyivel sem volt hatékonyabb. A 72 órás inkubációt követően azonban már hatékonyabbnak tűnt a normál csapvizetes tisztításnál, mert közel 200 TKE/cm²-vel kevesebb mikroba fejlődött ki, de a független minták T-tesztje alapján nem volt szignifikáns különbség a vízzel történő öblítés és a mosogatószerrel és vízzel történő tisztítás között. (Tabaco et al., 2018).

4. ábra: Palack tisztítás módszerének hatása a palack belső felületén mérhető mikrobakonzentrációra. (Forrás: Tabaco et al., (2018) nyomán)



Sun és munkatársai (2017) azt kutatták és vizsgálták, hogy mennyire tiszták az újrahasználatos vizes palackok és hogyan befolyásolja a szennyezettségi szintet a palackok használata. A kísérletben 90 palackot (65 db kemény műanyagból, 12 db puha műanyagból, 10 db fémből és 3 db üvegből készült). A 1. táblázatban jól kivehető a palackok külsejére fókuszáló vizsgálatból, hogy a fém esetén volt a legalacsonyabb és a legmagasabb érték is egyben. A biolumineszcencián alapuló ATP-kimutató teszt gyártója szerint a felület akkor tiszta, ha ≤ 10 RLU (relative light units, relatív fényegység) érték között van, 11-29 érték között nem megfelelően tisztítottnak tekinti. Így megállapítható, hogy mindegyik minta szennyezettnek minősült.

1. táblázat: A palack anyagának hatása a palack külső szennyezettségére biolumineszcencián alapuló ATP kimutató módszerével mérve
(Forrás: Sun et al., (2017) nyomán)

Palack anyaga	n	ATP-értékek RLU-ban kifejezve			
		Átlag	Standard eltérés	Minimum	Maximum
Üveg	3	281.70	66,11	211	342
Kemény műanyag	65	375.70	351,70	43	2165
Puha műanyag	12	391.10	258,10	47	1034
Fém	10	732.90	789,50	32	2510

A 2. táblázat tartalmazza a különböző italok és a baktériumok koncentrációja közti összefüggést. A válaszadók a fent említett kísérlethez hasonlóan szintén vizet fogyasztanak legtöbbször (81,82%) a palackokból. A vizsgált személyek 18,18% -a kávé, teát, energiatalokat és egyéb italokat fogyasztottak. Emiatt az összes mikrobaszám és kólibaktérium- értékek szignifikánsan magasabbak voltak, mint a normál vízzel töltött palackokban (Sun et al., 2017).

2. táblázat: Összes mikrobaszám alakulása különböző folyadékok esetén a palackokban (víz, egyéb: kávé, tea, energiatál) Az elmúlt 7 napban a palackokban fogyasztott italoknak a hatása.
(Forrás: Sun et al., (2017) nyomán)

Ital	n	Rész- arány (%)	Összes mikrobaszám eredmény /ml értékben kifejezve					Kóliform
			Átlag	Standard eltérés	Min.	Max.	P- érték	P- érték
Víz	72	81,82%	$7,07 \times 10^3$	$1,44 \times 10^4$	<1	$6,63 \times 10^4$	0,02	<0,01
Egyéb	16	18,18%	$5,54 \times 10^5$	$2,10 \times 10^6$	4	$8,03 \times 10^6$		

Végeredményben a palackok felülete mikrobák és ezáltal fertőzések forrása lehet. Ennek mértékét a palack anyaga befolyásolhatja. Az üveg külső felületén a legalacsonyabb a szerves maradványok értéke. Ez annak köszönhető, hogy az üveg a legkevésbé porózusabb és könnyen tisztítható, előnye még a műanyaggal és fémmel szemben, hogy áttetsző, így a szennyeződés könnyen észrevehető (Sun és munkatársai, 2017). A legjobb választás, így az üvegből készült palackok lehetnek. A fém palackokat nézve viszont tartósabbak és ellenállóbbak az üveggel szemben, ami a napi használat szempontjából kedvezőbb. Abban az esetben, ha fém felülete mikrokarcolásoktól mentes a mikroorganizmusok nem tudnak megbújni a karcokban. A műanyag a legkevésbé praktikus választás, mivel ez a legporózusabb a fémhez és üveghez képest, így a szerves maradványok könnyebben megtapadhatnak és ez a mikroorganizmusoknak tökéletes életteret tud biztosítani.

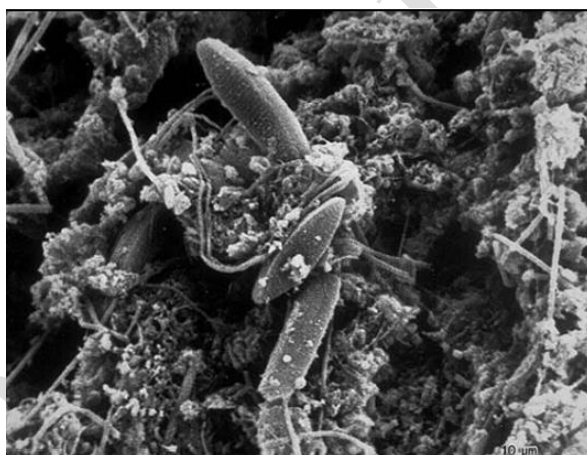
2.3. A biofilmek

A mikrobiológia történetének legnagyobb részében a mikroorganizmusokat elsősorban planktonikus, szabadon lebegő sejtekként jellemezték, és a tápanyagban gazdag táptalajon történő növekedési jellemzőik alapján írták le. Azonban Van Leeuwenhoek egyszerű mikroszkópjaival először figyelt meg mikroorganizmusokat a fogak felületén, és neki tulajdonítható a mikrobiális biofilmek felfedezése. Ezáltal ő írta le először azt a mikrobiológiai jelenséget, miszerint a mikroorganizmusok a szabad felületekre tapadnak és ott általánosan növekednek (Donlan, 2002). Ma már széles körben elismert tény, hogy a természetes környezetben a baktériumsejtek leggyakrabban felületekhez és határfelületekhez szorosan kapcsolódva, többsejtű aggregátumok formájában találhatók meg, amelyeket általában biofilmnek neveznek. Ez a többsejtűségre való hajlam a baktériumsejteket sok más élősejt-típushoz teszi hasonlóvá: képesek egysejtű létre, mégis általában többsejtű közösségekben élnek. A biofilmek számos előnyt kínálnak a bennük élő sejteknek, amelyek közül az egyik legfontosabb a környezeti ártalmakkal és támadásokkal szembeni védelem (Branda et al., 2005). A mikrobiális biofilmeket általában háromdimenziós struktúrában kialakult helyhez kötött mikrobiális közösségekként határozzák meg, amelyek prokarióta és/vagy eukarióta sejtekből álló többsejtű közösségekből állnak, és legalább részben a mikrobiális közösség által szintetizált anyagból álló mátrixba ágyazódnak. A biofilmképződés többlépcsős folyamat, amely mikrobiális adhézióval kezdődik, majd ezt követően egy vagy több polimer anyagból, például fehérjékből, poliszacharidokból, humuszos anyagokból, extracelluláris DNS-ből és néha más molekulákból, például a sejtek közötti kommunikációban részt vevő molekulákból álló extracelluláris mátrix termelődik és halmozódik fel (Azeredo et al., 2016). A biofilm ezáltal

a Földön az egyik legszélesebb körben elterjedt és legsokoldalúbb életforma és a legtöbb elem biogeokémiai körforgási folyamatait irányítják a vízben, talajban, üledékben és felszín alatti környezetben (Flemming et al., 2016).

Donlan (2002) megfogalmazása alapján a biofilmek egy olyan mikrobiális sejtek összessége, amelyek visszafordíthatatlanul társulnak (kíméletes öblítéssel nem távolíthatók el) egy felülettel, és egy elsősorban poliszacharid anyagból álló mátrixba vannak zárva. A biofilm mátrixában nem sejtes anyagok, például ásványi kristályok, korróziós részecskék, agyag- vagy iszaprészecskék vagy vérkomponensek is megtalálhatók, attól függően, hogy milyen környezetben alakult ki a biofilm. A planktonikus (szabadon lebegő) társaiktól is különböznek az átvírt gének tekintetében a biofilmek. A biofilmek a legkülönbözőbb felületeken alakulhatnak ki, beleértve az élő szöveteket, a beültetett orvosi eszközöket, az ipari vagy ivóvízrendszerek csővezetékét vagy a természetes vízi rendszereket. Az 5. ábrán egy pásztázó elektronmikroszkópos felvétel szemlélteti a kialakult biofilmet egy ipari vízrendszerből.

5. ábra: Elektronmikroszkópos kép egy ipari vízvezetékben kialakult biofilmről
(Forrás: Donlan (2002))



A biofilmek felelősek a technológiai víz biológiai szennyeződéséért, az ivóvíz higiéniai minőségének romlásáért és a mikrobák okozta korrózióért. A biofilmekben a sejtek nagy koncentrációban fordulnak elő (10^8 - 10^{11} sejt/g nedves tömeg) és jellemzően több fajhoz tartoznak. A biofilmek sokfélesége abból adódik, hogy a sejtek a helyi adottságoknak megfelelően különbözőképpen fejlődnek. Az életciklusuk során a gének és fehérjék a megfelelő időben aktiválódnak, hasonlóan ahhoz, ahogy a mikroorganizmusok változatos környezetekben növekednek és fejlődnek (Flemming et al., 2016). Verseny is kialakulhat a biofilmekben belül, és kimutatták, hogy a *Hyphomicrobium* sp. biofilm *P. putida* általi inváziója a *P. putida* dominanciáját eredményezte, még akkor is, ha a biofilmhez kapcsolódó *Hyphomicrobiumok* száma viszonylag állandó maradt. Egy másik tanulmányban a *K. pneumoniae*-t és *P.*

aeruginosa-t tartalmazó biofilmeket vizsgáltak, és megállapították, hogy mindkét faj képes stabil közösségben együtt élni, még akkor is, ha a *P. aeruginosa* növekedési sebessége sokkal lassabb a kevert kultúrájú biofilmben, mint amikor tiszta kultúrájú biofilmként tenyésztik. A *P. aeruginosa* elsősorban alap biofilmként növekszik, míg a *K. pneumoniae* lokalizált mikrokolóniákat alkot, amelyeknek nagyobb hozzáférése lehet a tápanyagokhoz és az oxigénhez (Donlan, 2002).

A biofilmek kialakulásának megelőzésére az egyik stratégia a rendszeres fertőtlenítés. A biofilm kialakulásának kezdeti szakasza, a mikrobák felülethez való rögzülése azonban meglehetősen gyors folyamat, és csak néhány órát vesz igénybe. Főleg ebben a kezdeti fázisban alakul ki a fenotípusos alkalmazkodás (Meyer, 2003). Szabadon úszó planktonikus társaikhoz képest a biofilmek általában fokozott védelmet mutatnak számos stresszfaktorról szemben. Az ivóvízi biofilmek esetében ezek közé tartozik a fertőtlenítőszerrel, a nyírási stressz körülményeivel és a hőstresszel szembeni ellenálló képesség (Liu et al., 2016).

2.3.1. Biofilmek előfordulása különböző felületeken

Az ivóvíz elosztórendszerekben a biofilm előfordulása műszaki és higiéniai problémákkal jár. A biofilmben elszaporodó mikrobák a vízbe kerülve rontják a víz minőségét. Egyes biofilmben előforduló mikrobák íz- és szaghatást okozhatnak a vízben, vagy patogének lehetnek. A biofilm védi a mikrobákat a fertőtlenítés ellen. A biofilm a csővezetékek anyagainak korrózióját is fokozza. A mikroorganizmusok felhalmozódása a felületeken és a biofilm kialakulása számos, a vízben uralkodó tényezőtől függ pl. a felületi anyag típusa, a mikrobák előfordulása a vízben, a tápanyagok és fertőtlenítőszer koncentrációja és minősége, a hőmérséklet és a rendszer hidraulikája (Zacheus et al., 2000).

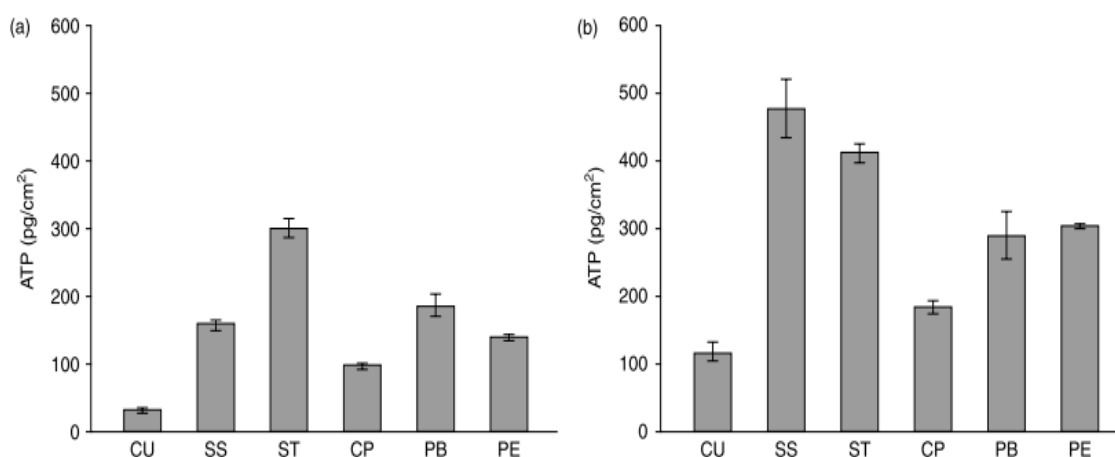
Egyes csővezetékeknek a kémiai vegyületei, mint például a réz-, vas-, és foszforionok, valamint a szerves vegyületek felszabadulásával szintén befolyásolhatják a mikrobák elszaporodását. A rézcsővekben a biofilm kialakulása lassabb, mint a polietilén (PE) csővekben, és a rézionok alacsonyabb mikrobaszámot eredményeznek a vízben is. Ezzel szemben a PE csővek, amelyeket a közelmúltban a hagyományos fém vízvezetékek költséghatékony helyettesítésére használtak, biológiailag lebomló szerves vegyületeket és foszfort szabadíthatnak fel, amelyek mikrobiális újránövekedést és biofilmképződést idézhetnek elő. Nemcsak a csővezeték anyaga, hanem a felszíne is fontos befolyásoló tényező a mikrobák megtapadása szempontjából: durva felületű anyagokból, például öntöttvasból, horganyzott acélból készült csőveken a biofilm

újranövekedése nagyobb volt, mint a sima felületű polivinil-klorid (PVC) csöveken (Yu et al., 2010).

Obiofu és munkatársai (2018) vizsgálatainak eredményei is megerősítették, hogy a hosszú távú tárolás befolyásolhatja a víz minőségét és növelheti az életképes sejtek számát a víztároló edényekben. Azonosították a különböző víztároló tartályokban a *Pseudomonas aeruginosa*-t, mint biofilmképző organizmust. Az ivóvíz tárolására leginkább alkalmas tartályoknak a horganyzott acél vagy a rozsdamentes acél bizonyultak. Az alumínium, az agyag, az üveg és a polimer tartályok nem ajánlottak a víz hosszú távú tárolására, mivel elősegíthetik a biofilmképződést.

Yu és munkatársai (2010) kísérletében az ivóvizet és a kevert vizet (10% (v/v) folyóvizet is tartalmazott) vizsgálták, annak érdekében, hogy képet kapjanak arról, hogy a vízvezeték anyagok milyen hatást gyakorolnak a biofilmképződési potenciálra és a biofilmekben lévő mikrobális közösségekre. A vizsgált anyagok a rozsdamentes acél (SS), cinkkel bevont acél (ST), klórozott műanyag (CP), polibutilén (PB), polietilén (PE) voltak. A 6. ábrán látható eredményekből is látszódik, hogy a kevert víz több mikroorganizmust tartalmazott. Ez annak tulajdonítható, hogy az ivóvíz átesik egy meghatározott tisztítási folyamaton. Az ivóvíz esetében az értékek 30 – 300 pg/cm² között mozogtak a vízvezetékben, ezzel szemben a kevert víz esetén jóval magasabb 114 – 474 pg/cm² értékeket kaptak. Mindkét típusú vízminta esetén kimutatható volt a csővezeték anyagának befolyásoló hatása a biofilm képződésre.

6. ábra: A különböző csőanyagokon kialakuló biofilmek ATP-koncentrációja 90 napos inkubáció után ivóvízben (a) és kevert vízben (b) (CU- réz, SS- rozsdamentes acél, ST- cinkkel bevont acél, CP- klórozott műanyag, PB- polibutilén, PE- polietilén) (Forrás: Yu et al., (2010))



2.4. A száj mikrobiótája

Az ember és a szájüreg mikroflóra közötti kapcsolat nem sokkal a születés után kezdődik és egy teljes életen át tart (Jenkinson és Lamont, 2005). A száj baktérium populációja rendkívül összetett, mintegy 1000 fajjal, beleértve a vírusokat, protozoonokat, gombákat, archeákat és baktériumokat (Wade, 2013). A szájüreg normális részét alkotják, és fontos funkciója, hogy védelmet nyújtson a külső baktériumok kolonizációjával szemben, amelyek hatással lehetnek az egész szervezet egészségére (Arweiler és Netuschil, 2016). Ez annak is köszönhető, hogy az ember sem önálló szervezet, ezáltal különböző mikrobális szimbionták és genomjaik kapcsolatban állnak a szervezetének biológiai működésével. A testünk belső és külső felületein mikrobiális populációk telepednek meg, és olyan működésű egységet alakítanak ki, amely kulcsfontosságú az egészségünk, illetve szervezetünk működése szempontjából (Mosaddad et al., 2019). Krzysciak és munkatársai (2016) azt állítják, hogy a szájüreg a baktériumfajok sokféleségét tekintve az emberi szervezet egyik leggazdagabb mikrobiom helyszínének tekinthető. A szájüreg mikrobiomja nehezen számszerűsíthető, anatómiailag korlátozott, elkülönülő ökológiai niche-t képviselő mikrobiótákból áll. Ezek a részek a fogak, nyelv, szájpadlás, fogínyseb, fogíny, íny és a többi. Ezenfelül a szimbiózisban élő és patogén mikroorganizmusok a szájüregben planktonikus (gyakori a nyálban) és biofilm formájában (gyakori a foglepedékben) is előfordulhatnak (Tang et al., 2020). A kifejlődő fogak esetén védő glikoprotein bevonatot kapnak, ami elindítja a szukcesszív mikrobiális kolonizációt, ami komplex polimikrobiális biofilmközösségek, nevezetesen a foglepedék kialakulásához vezet. Ezek a komplex foglepedék mátrixok egyedi mikrokörnyezeteket hoznak létre, amelyek savas és anaerob mikrokörnyezeteket rejtenek, és így a közvetlenül a fogfelszínen növekvő szervezetektől eltérő organizmusokat szelektálnak (Sedghi et al., 2000). A nyál a szájüregi mikrobióta planktonikus fázisát képviseli. A bakteriális laboratóriumi folyadékkultúrához hasonlóan akár 10^9 mikroorganizmust is tartalmazhat milliliterenként. A nyál az elsődleges forrása a változatos szájüregi puha és kemény felületek folyamatos bakteriális újrakolonizációjának (Arweiler és Netuschil, 2016). A legegységesebb topográfiai jellemző a mikrobális közösség megkülönböztetésére az, hogy egy adott hely felszíni szöveti rétege vedlő, vagyis a szájnyálkahártya; vagy nem vedlő, vagyis a fogzománc (Proctor és Relman, 2017). Valószínű, hogy ezeknek a közösségeknek az egyes komponensei közül sokan nem tudnak túlélni más körülmény között, mert metabolikus kölcsönhatásban állnak egymással, így például a laboratóriumban nem lehet kitenyészteni őket (Jenkinson és Lamont, 2005). Az anatómiai szerkezeten kívül más tényezők is befolyásolják az emberi szájban levő mikrobióták

összetételét. Az egyik a nyál változó mennyisége, amely védőréteggént is funkcionál a szájüreg megfelelő állapotának fenntartásának érdekében. További tényezők a táplálkozás, higiéniai szokások, gazdaszervezet genetikája, földrajzi elhelyezkedés, életkor (Krzyściak et al., 2016; Burcham et al., 2020). A szájüregi mikrobiótában az egészséges baktériumok egyensúlyának fenntartása nemcsak a szájüregi, hanem az általános egészségi állapot szempontjából is kritikus szerepet játszik (Burcham et al., 2020). Ezáltal a szájüreg az emberi test egyik legfontosabb kapuja. Az étel a szájba kerül, megrágnak és nyállal keveredik a gyomor és a bélrendszer felé vezető úton. A levegő az orron és a szájon keresztül jut el a légcsőbe és a tüdőbe. A szájüreg egy területét benépesítő mikroorganizmusok jelentős valószínűséggel áttérnek a szomszédos hámfelületeken a szomszédos helyekre. A szájüregből származó mikroorganizmusok bizonyítottan számos szájüregi fertőző betegséget okoznak, beleértve a fogszuvasodást, a parodontitist (ínybetegség), az endodontikus (gyökércsatorna) fertőzéseket és a mandulagyulladást. Egyre több olyan bizonyíték gyűlik össze, amely a szájüregi baktériumokat számos szisztémás betegséggel, köztük a szív- és érrendszeri betegségekkel, a stroke-kal, a koraszüléssel, a cukorbetegséggel és a tüdőgyulladással hozza összefüggésbe (Dewhirst et al., 2010).

Becslések szerint az emberi szájüregben megtelepedő baktériumok 50% -át még nem tenyésztették ki. Így lehetséges, hogy az eddig tanulmányozott tenyésztethető organizmusok csak viszonylag kis részét képezik egyes szájüregi közösségek (Jenkinson és Lamont, 2005).

Burcham és munkatársai (2020) szerint a törzsmikrobiomhoz gyakran tartozónak tekintett nemzetségek a következők: *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Rothia*, amelyek a legtöbb egészséges emberben megtalálhatóak. A mikrobális tájképben, pedig összességében a *Streptococcus* nemzetség dominál.

A 2000-es évek elején a koaguláz-negatív *Staphylococcus*-ok kapcsán megjelent átfogó szakirodalom ellenére viszonylag kevés figyelmet fordítottak a szájüregre, mint rezervoárjára. Ebből adódóan viszonylag kevés részletes tanulmány készült a sztafilokokkusok szájban való eloszlásáról (Smith et al., 2001). A *Staphylococcus epidermidis* gyakori humán mikroorganizmusként mindenütt jelen van a bőrön és a nedves nyálkahártya felszíneken, emiatt gyakori és fontos oportunista kórokozóvá vált, különösképpen az immunhiányos szervezetek körében (Tang et al., 2020). Mosaddad és munkatársai (2019) szerint az egészséges szájüregben a legnagyobb gyakorisággal fordul elő a *Staphylococcus* nemzetség.

Goldberg és munkatársai (1997) megemlítették, hogy egy korábbi jelentés azt feltételezte, hogy az *Enterobacteriaceae* család tagjai közé tartozó *Klebsiella* fajok részt vehetnek a szájszag kialakulásában. Azonban általánosságban nem tekintik a szájüregi mikrobióta fontos tagjainak, mivel egy vizsgálat során csupán az alanyok mindössze 0-24% -ban találtak ilyen mikroorganizmusokat. Bratić és munkatársai (2021) kísérletének eredményeként a szájüregi kenetek az esetek csak 9,5%-ban tartalmaztak Gram-negatív kórokozókat. Az izolátumokban a *Klebsiella oxytoca* is megtalálható volt. Da Rocha Santos és munkatársai (2023) kísérletükben 285 tenyészetet készítettek nyálból és vérből. Eredményül azt kapták, hogy 10 nyál-tenyészetben növekedett *K. oxytoca*.

A *Stenotrophomonas maltophilia* gyakran megtelepszik a betegek testnedveiben (nyálkahártya, légzőszervi aeroszolok, vizelet, sebváladék) (Adegoke et al., 2017). Brooke (2012) leírta, hogy a *S. maltophilia* vizes élőhelyeken, többek között rizoszférában, állatokban, vízforrásokban és élelmiszerekben fordul elő, tehát nem alkotja az emberi száj természetes mikrobiótáját.

Sutter és munkatársai (1966) vizsgálatot végeztek a nyálból kimutatható *Pseudomonas* nemzetségekre. A kísérletet 350 alanyon végezték el, amelynek eredményeképpen a *P. aeruginosa*-t mutatták ki 23 mintából, addig a *P. putida*-t csak 6 személynek a nyálából sikerült kimutatni. Arra következtettek, hogy valószínűleg ezek a fajok átmenetileg találhatóak meg a nyálban.

Salam és munkatársai kísérletében (2001) 125 idősebb korosztályú ember vett részt Japánban, akiknek az általános egészségi állapotuk jó volt, és nem igényeltek különösebb segítséget a napi tevékenységeikhez. A teljes műfogsort használó alanyok esetében először a műfogsort eltávolították a szájüregből, majd a mintákat ugyanazon régióiból vették minden egyes műfogsorról. A műfogsorral nem rendelkező alanyoktól a szemben lévő fogakból vettek mintát. Az alanyokat arra kérték, hogy rágjanak paraffint a nyáleválasztás serkentése érdekében, amelyet vattapamacs segítségével gyűjtöttek jégbehűtött steril üvegekbe. Emellett pedig még a mandulákról is vettek mintákat, így ezáltal a fogakon, a nyálban és a mandulákon levő mikroorganizmusokról kaphattak átfogó képet. Az eredmények azt mutatták (3. táblázat), hogy a *Candida albicans*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp., *S. aureus*, *Xanthomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. marcescens*, koaguláz-negatív *Staphylococcus* (CNS) és *K. oxytoca* volt a leggyakrabban izolált mikrobák a mintából.

3. táblázat: Mikroorganizmusok izolálási gyakorisága fogkőben, nyálban és mandulában
(Forrás: Salam et al., (2001) nyomán)

Mikroorganizmus	Fogkő (n = 125) (%)	Nyál (n = 125) (%)	Mandula (n = 125) (%)
<i>Candida albicans</i>	14	17	11
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	19	16
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	5	5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ~ <i>Xanthomonas maltophilia</i>	4	4	3
<i>Pseudomonas putida</i>	1	3	4
<i>Staphylococcus aureus</i> (CNS)	5	3	2

Ezeknek a mikroorganizmusoknak a nagyobb előfordulási gyakorisága az idősök körében azt jelzi, hogy ez a korcsoport nagyobb kockázatnak van kitéve az olyan szisztémás betegségeknek, mint a tüdőgyulladás és a szívbetegség. A fogászati biofilmből a kórokozókat eltávolító professzionális szájhygiénia jelentősen csökkentheti a szisztémás betegségek kockázatát az idősöknél (Salam et al., 2001).

2.5. A vizsgált baktériumok tulajdonságai és biofilmképző képessége

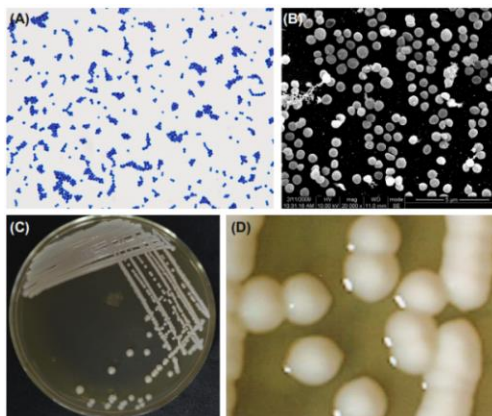
2.5.1. *Staphylococcus epidermidis*

A *Staphylococcus epidermidis*, egy koaguláz-negatív baktérium, amelyet korábban az emberi bőr ártalmatlan kommenzális mikroorganizmusának tekintettek, viszont ma már fontos opportunista kórokozónak számít. Jelenleg a virulensebb rokonával a *S. aureus*sal együtt az első helyen állnak a nosokomiális fertőzések kórokozói között (Otto, 2009). A *S. epidermidis* nem csak az emlősök bőrén, hanem nyálkahártyáján is megtelepedő baktérium, amely az emberben leggyakrabban előforduló *Staphylococcus* faj. Epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az egészséges emberek egyszerre 10-24 különböző *S. epidermidis* törzset hordoznak (Fey és Olson, 2010). *S. epidermidis* kifejezetten az orvostechikai eszközökön is előfordul, ez abból eredhet, hogy a bőr, nyálkahártya állandó és mindenütt jelen levő kolonizálója lett. Ezáltal nagy az esély arra, hogy az eszköz behelyezése során kontaminálódik (Otto, 2009). Az orvosi gyakorlat fejlődésével párhuzamosan ez a faj vált az elsődleges bakterémia, valamint a beültetett orvosi eszközök fertőzésének leggyakoribb okává, különösen az immunhiányos egyének és újszülöttek esetében (Fey és Olson, 2010). A fajban jelen lévő specifikus ARG (antibiotic resistance genes – antibiotikum rezisztenciát hordozó gének) és a biofilmek kialakítására való hajlama hozzájárul patogenitásához és fertőzéseinek kezelésének

bonyolultságához, ami jelentős terhet jelent a közegészségügyi rendszer számára (Tang et al., 2020). A koaguláz-negatív *Staphylococcus epidermidis* jelenleg a leggyakrabban izolált mikroorganizmusok az akut és krónikus mű izületi fertőzésekben (Castellanos et al., 2014). A bőr fő lakója, az aerob rezidens flóra több, mint 90% -át alkotja. Ezt a fajt a nemzetség többi tagjától a következő tulajdonságok különböztetik meg: kokkusz alak, desferrioxamin-érzékenység, savból történő trehalóz termelés hiánya, a kis fehér vagy bézs színű telepek képződése és a fentebb említett koaguláz-negatív tulajdonság. A *S. epidermidis* általában ártalmatlana jól működő immunrendszerrel rendelkező emberek esetén (MacLeod et al., 2009).

A *S. epidermidis* fakultatív anaerob baktérium, de aerob körülmények között is jól növekszik. A *S. epidermidis* tenyésztési feltételei hasonlóak a *S. aureus*-hoz, de a *S. epidermidis* lassan növekszik 10% NaCl-t tartalmazó táptalajon. A telepei kerek, domborúak, fényesek, szürkék és teljes szélűek (7. ábra). Átmérőjük körülbelül 2,5 mm. Általában nem termelnek hemolitikus zónát. A nyálkát termelni képes törzsek áttetsző, ragacsos kolóniákat képeznek (Zhou, 2015) A *Staphylococcus* fajok széles hőmérséklet-tartományban képesek növekedni (6,5-46°C), bár optimális hőmérséklet-tartományuk 30-37°C, és azt feltételezik, hogy korlátozott ideig 6,5-46°C -os szélsőséges hőmérsékleten is képesek a túlélésre. A *Staphylococcus* fajok azon képessége, hogy gyorsan alkalmazkodnak az ingadozó alacsony és magas hőmérséklethez, különösen fontos a patogén fajok szempontjából, mivel vannak olyan esetek, amikor ezeknek a baktériumoknak a gazdaszervezeten kívül is életképesnek kell maradniuk (Onyango et al., 2012).

7. ábra: A) *Staphylococcus epidermidis* sejtek (Gram-festés). (B) *S. epidermidis* sejtek (SEM). A *S. epidermidis* sejtek gömb alakúak (0,5-1,5 µm átmérőjűek) és Gram-pozitívok. A kókuszos tetradákba és klaszterekbe szerveződnek. Esetenként egyes sejtek is megfigyelhetők. (C) *S. epidermidis* kolóniák agarlemezen inkubálva. (D) *S. epidermidis* kolóniák (sztereomikroszkóp) (Forrás: Zhou, (2015)).



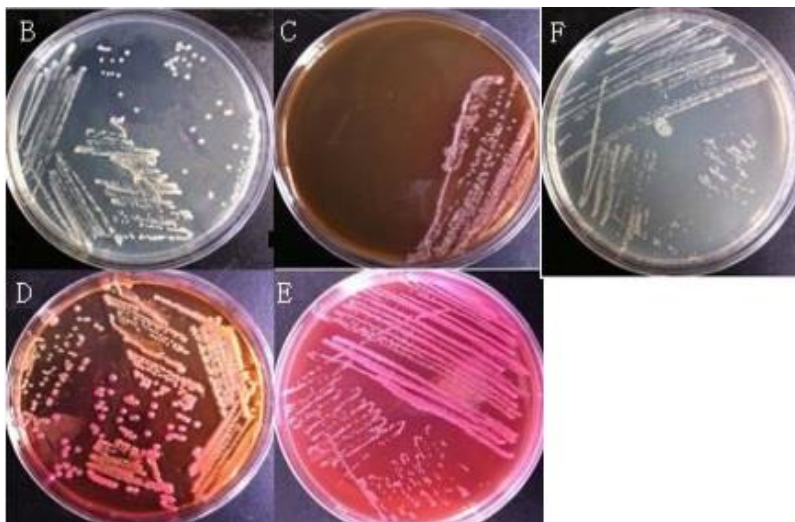
Staphylococcus epidermidis és a *S. sanguinis* a humán szájüregi mikrobiom bakteriális tagjai; ezek a baktériumok általában az ember nyálkahártyáján élnek, és képesek a szájüreg kemény felületeihez kötődni. Néhány közelmúltbeli tanulmányban a *S. epidermidis*-t a meghibásodott fogászati implantátumokon lévő patogén biofilmekben is kimutatták (Bürgers et al., 2012). A *S. epidermidis* biofilm ellenáll az antibiotikumok káros hatásának, és akadályozza a gazdaszervezet immunválasztát. Így a *S. epidermidis* biofilm által közvetített fertőzésben szenvedő betegek kezelése általában a károsító eszköz eltávolításával, majd cseréjével jár, ami növeli a morbiditást és a költségeket (Fey és Olson, 2010).

2.5.2. *Klebsiella oxytoca*

A *K. oxytoca* az *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Klebsiella* nemzetséghez tartozó Gram-negatív baktérium, amely széles körben elterjedt a természetben (Yang et al., 2022). A természetben megtalálható a talajban, szennyvízben, felszíni vizekben, növényeken, és megtalálhatóak továbbá az emberek, a sertések és lófélék nyálkahártya-felületein (Abood és Ibrahim, 2017). Emberekben a normál bélflóra tagja, tenyésztési módszerekkel egészséges felnőttek 8-10% -nak székletéből mutatták ki. A bélflóra mellett a bőrön és az oropharynxban (száj-garat) is megtalálható. Annak ellenére, hogy kommenzális mikrobióta tagja, mégis humán patogén, amely az enyhe hasmenéstől az agyhártyagyulladásig az életveszélyes bakterémiáig számos fertőzést okoz. Jelentősége ellenére a *K. oxytoca* viszonylag kevésbé ismert, mert a közismert rokona (*Klebsiella pneumoniae*) árnyékot vet rá. Fontos különbség köztük, hogy a *K. oxytoca* antimikrobális rezisztenciával rendelkezik. Génjeiben kódolja a fibriákat, amely lehetővé teszik a felületekhez való kapcsolódását és ezáltal a biofilmek kialakulását. Egy vizsgálatban az AAHC (antibiotic-associated hemorrhagic colitis – nem élelmiszer eredetű vérzéses vastagbélgyulladás) betegekből származó *K. oxytoca* izolátumok 70% -a közepes mértékű biofilmet termelt. Egy másik vizsgálatban a vastagbélrákos betegekből származó izolátumok 78% -a termelt közepes méretű biofilmet (Yang et al., 2022).

A *Klebsiella* nemzetségre jellemző sejtmorfológia az egyenes, nem mozgékony, kapszulázott, 0,3-1,0 pm x 0,6-6 pm méretű pálca. A *K. oxytoca* törzsek glükonátot és vas-citrátot tartalmazó táptalajon történő növekedéskor sötétbarna színezéket termelnek. Kolonizációjának jellemzője a különböző mértékben szúrós, csillogó, nedves telepek (8. ábra). Fakultatív anaerob, optimális növekedési hőmérséklete 35-37 °C (Osatogbe et al., 2023).

8. ábra: *A K. oxytoca* tenyésztési jellemzői különböző körülmények között. B) Tápanyagleves agarlemez; C) juhvér agar táptalaj; D) MacConkey táptalaj; E) SS agar táptalaj; F) LB agar.
(Forrás: Chang et al. (2018))



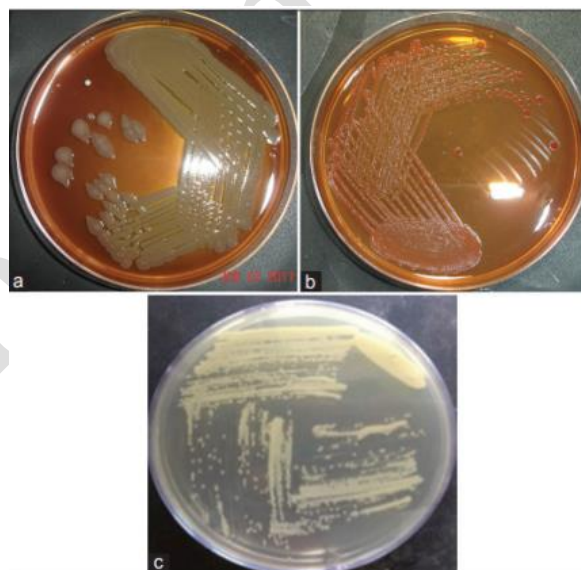
Abood és Ibrahim kísérletében (2017) 90 *Klebsiella* spp. izolátumot gyűjtöttek különböző klinikai mintákból, vizeletmintából, köpetből, sebtamponból, égési tamponból, fültamponból és gennyes tamponból. Az API20E-vel végezték a vizsgálatot, aminek az eredményeképpen a 90 izolátumból 53 *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, 29 *Klebsiella pneumoniae* ssp. *Ozaenae* és 8 *Klebsiella oxytoca* izolátum volt. Emellett a *Klebsiella oxytoca* izolátumok 50%-ban erős és közepes mértékű biofilm képződést mutattak ki minden fokozatban glükóz jelenlétében és glükóz jelenléte nélkül is. Ebben a tanulmányban végeztek kísérletet arra is, hogy üveg- és műanyagcsőben képesek-e biofilmet képezni. Megállapították, hogy üvegen kevésbé tudott biofilmet kialakítani, mint a műanyag felületen. A *Klebsiella oxytoca* az üvegcső esetén 25%-os a műanyagcső esetében-50%-os mérsékelt biofilmképző tulajdonságot mutatott. Az izolátumok 25%-a az üvegnél, és 12,5%-a műanyagnál nem hozott létre biofilmet.

2.5.3. *Stenotrophomonas maltophilia*

A *S. maltophilia* egy globálisan megjelenő Gram-negatív multirezisztens organizmus, amely leggyakrabban az emberek légúti fertőzéseivel, és a cisztás fibriózisban szenvedő betegek krónikus tüdőfertőzéseivel hozható összefüggésbe, emellett súlyos fertőzéseket (légút, bőr, véráram, lágyrészek, húgyutak) okozhat az emberekben (Brooke, 2012; Flores-Treviño et al., 2019). Adegoke és munkatársai (2017) szerint ez egy feltételezhetően alacsony virulenciájú, mégis opportunista kórokozónak élénk kommenzális organizmus. *Stenotrophomonas maltophilia* egy olyan kórokozó, amely az utóbbi időben egyre nagyobb jelentőségre tett szert az orvostudományban, mivel egyre gyakrabban fordul elő nosokomiális betegségeket okozó kórokozónak (Flores-Treviño et al., 2019). Ez a baktérium, általában a környezetben szabadon

él, és nozokomiális (kórházi) és közösségi fertőzésekben játszik szerepet. Különböző fertőző betegségekért és halálozásért felelős a kórházi betegek körében, különösen az immunszuppresszált, orvosi implantátumokkal rendelkező, és immunhiányos betegeknél. Méretét tekintve kisebbek a *Stenotrophomonas* nemzetség más fajainál. Poláris flagellák segítségével mozgékonyak, kataláz pozitívak, általában oxidáz-negatívak, és rendelkeznek lizindekarboxilázzal (Adegoke et al., 2017). Képes géneket átvenni Gram-pozitív baktériumoktól. Ezek a gének általában az antibiotikum- és nehézfém-rezisztenciában játszanak szerepet. Emellett képes ő is géneket átadni, ezáltal akár antibiotikum-rezisztenciát más baktériumoknak (Brooke, 2012). A sejtjei egyenes vagy enyhén görbült, spórát nem képző, 0,5-1,5 µm hosszú, Gram-negatív pálcák, amelyek egyenként vagy párban fordulnak elő. A telepek sima, csillogó, teljes szélűek, fehér vagy halványsárga színűek, egyes táptalajokon előfordulhat a törzsek barnás elszíneződése (9. ábra). Életfeltételeit tekintve obligát aerob, növekedése nem következik be 5°C-nál alacsonyabb és 40 °C-nál magasabb hőmérsékleten. Az optimális szaporodási hőmérséklete 35 °C. Több vizsgálatban is bebizonyosodott, hogy a nedves környezet kedvez a túléléséhez (Denton és Kerr, 1998).

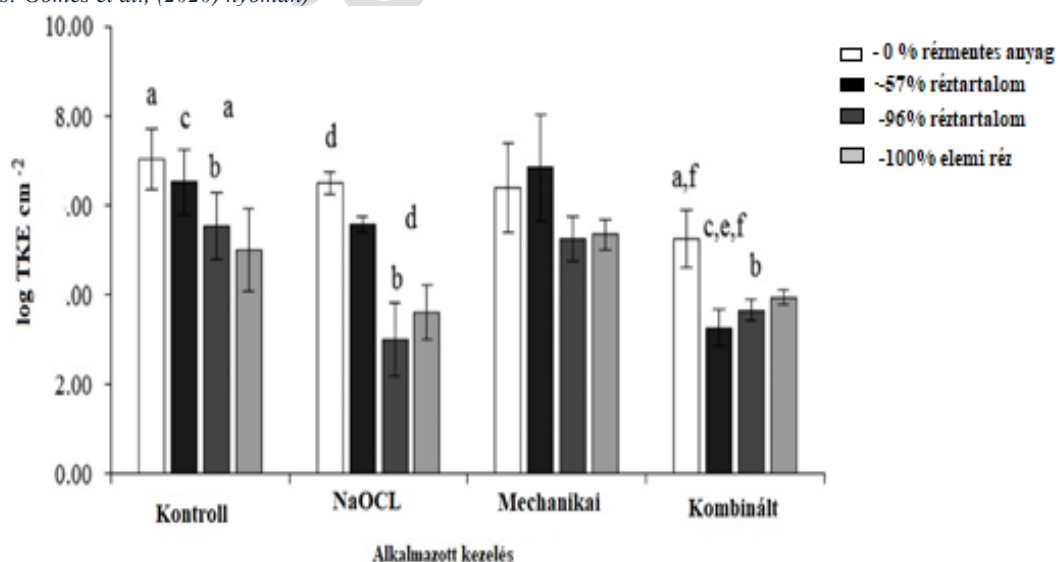
9. ábra: A *Stenotrophomonas maltophilia* kolóniái a) vér-agar lemezen, b) MacConkey agar lemezen, c) Mueller-Hinton agar lemezen
(Forrás: Singhal et al., (2018))



A baktérium egyik fontos jellemzője, hogy képes biofilmeket képezni a felületeken. Ezek a felületek a teflon, üveg, műanyagok, rozsdamentes acél, valamint gazdaszövetek (Adegoke et al., 2017); Brooke, 2012). A kórházi fertőzésekért becslések szerint 65% -ért a biofilmek a felelősek (Brooke, 2012). Brooke (2012) leírta egy korábbi kísérlet eredményét, mely szerint a *S. maltophilia* sejtek a beoltást követő 2 órán belül képesek megtapadni polisztirol felszíneken, 24 órán belül pedig biofilmet képeznek.

Gomes és munkatársai (2020) kísérletet végeztek arra vonatkozóan, hogy hogyan befolyásolja a réztartalom az *S. maltophilia* biofilm reakcióját a klórral és mechanikai stresszel történő kezelés hatására. Ebben a kísérletben a rozsdamentes acélt (stainless steel - SS) vették kontrol mintának. Eredményként kapták, hogy a biofilmképződést nem befolyásolja jelentősen a rézfelületek használata az SS-hez képest. Mindegyik képződött biofilm nagyrészt vízből állt (>96%). A rozsdamentes acélon magasabb volt a biofilm nedves tömege (96,8%) az 57% és 96% -ban rézet tartalmazó felületekhez képest. A fehérjetartalmat figyelembe véve a rozsdamentes acél esetén szintén magasabb ez az érték (16,4%), a réz anyagon képződött biofilmekkel szemben. A 10. ábra szemlélteti kísérletük eredményét a különböző kezelési módszereknek. A rozsdamentes acél tisztítási kísérleteinél kevésbé csökkent a mikrobaszám, ezzel szemben a réztartalmú felületeken megfigyelhető a nagyobb mértékű csökkenés a 96% és a 100% réztartalmú felületek esetében. Az 57%-os rézötvözetén képződött biofilmek tenyésztetőségében nem volt szignifikáns különbség az SS-hez képest ($p > 0,05$). A NaOCl-expozíció hatására bekövetkező TKE-csökkenés azonban csak a 96%-os rézötvözet használata esetén volt szignifikáns ($p < 0,05$). A mechanikai kezelés esetén (10 Pa nyírófeszültségnek való kitettség 30 másodpercig) nem okozott jelentős biofilm-eltávolítást ($p > 0,05$). A kombinált kezelés nem csökkentette a biofilmek képződését a 100% réztartalmú felületen. A kezelések kombinációja által okozott sejtkoncentráció csökkenés az 57%-os rézötvözetén képződött biofilmek esetében volt nagyobb, mint a klóros kezelés által okozott csökkenés ($p < 0,05$).

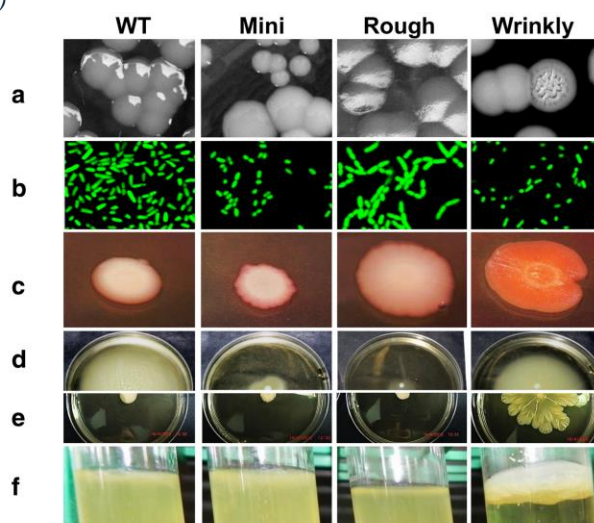
10. ábra: Kémiai és/vagy mechanikai kezelés hatása különböző réztartalmú felületeken kialakult biofilmekre
(Forrás: Gomes et al., (2020) nyomán)



2.5.4. *Pseudomonas putida*

A *Pseudomonas putida* egy Gram-negatív, pálcika alakú, laktózt nem fermentáló és oxidáz-pozitív baktérium. A *Pseudomonas* fajok fluoreszcens csoportjába tartozik. A faj egyik törzsét, a *P. putida* T2-2-t izolálták egy egészséges egyén nyelvének felületéről, és beszámoltak a quorum sensing aktivitásáról (Yoshino et al., 2010; Chan et al., 2014; Weimer et al., 2020). A *Pseudomonas putida* KT2440, egy jól jellemzett modelltörzs, optimálisan 30°C-on növekszik, de akár 4°C-on is képes szaporodni (Fonseca et al., 2011). A *P. putida* fehér, átlátszatlan közepű, 1-2 mm átmérőjű telepek formájában nőtt Marine agaron (Aboyadak et al., 2024; 11. ábra).

11. ábra: A *P. putida* változatok fenotípusos jellemzése. (A) Telepek morfológiája TSA Petri csészéken. (B) Sejtmorfológia. (C) Makrokolóniák szerkezete agarlemezeken. (D) Úszási és (E) rajképeség. (F) Pelliculumok képződése táptalajcsövekben (Forrás: Bridier et al., (2019))

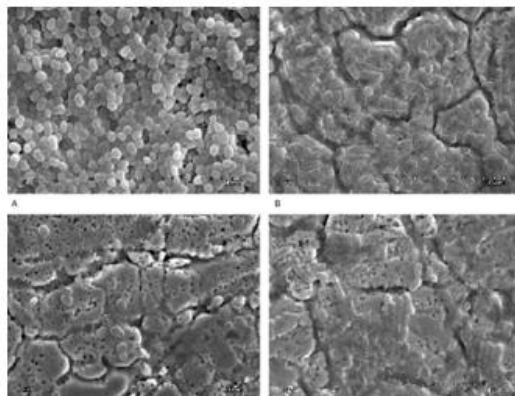


A fajok tagjai a vegyületek széles skáláját képesek metabolizálni, ennek köszönhetően képesek talajban, édesvízben és nedves környezetben elterjedni. A *Pseudomonas aeruginosa* a legelterjedtebb a nemzetségen belül, ugyanakkor nem csak ezt a fajt hozták kapcsolatba klinikai fertőzésekkel a nemzetségen belül. A *P. putida* által okozott fertőzések a bejelentések szerint újszülöttekben történtek (Yoshino et al., 2010). A *Pseudomonas putida* faj törzsei gyakori rizoszféra- és édesvízi lakosok, és bámulatos képességgel rendelkeznek a biogén és xenobiotikus vegyületek széles skálájának metabolizálására. E faj számos törzsét izolálták olyan betegekből, akik kórházi környezetben szereztek fertőzést. A *P. putida* által okozott fertőzések ritkák, és többnyire immunhiányos egyéneknél, például neutropeniában szenvedőknél, újszülötteknél és rákos betegeknél jelentik őket (Fernández et al., 2015).

Królasik és munkatársai (2010) megerősítették és megfigyelték azt, hogy a *P. putida* 4 órás inkubáció után rozsdamentes acélfelületen biofilmet képez. A 12. ábra szemlélteti a képződött biofilmek vizuális látványát. A 8 napos 20°C-os inkubáció után a teljes lemezfelületen vastag,

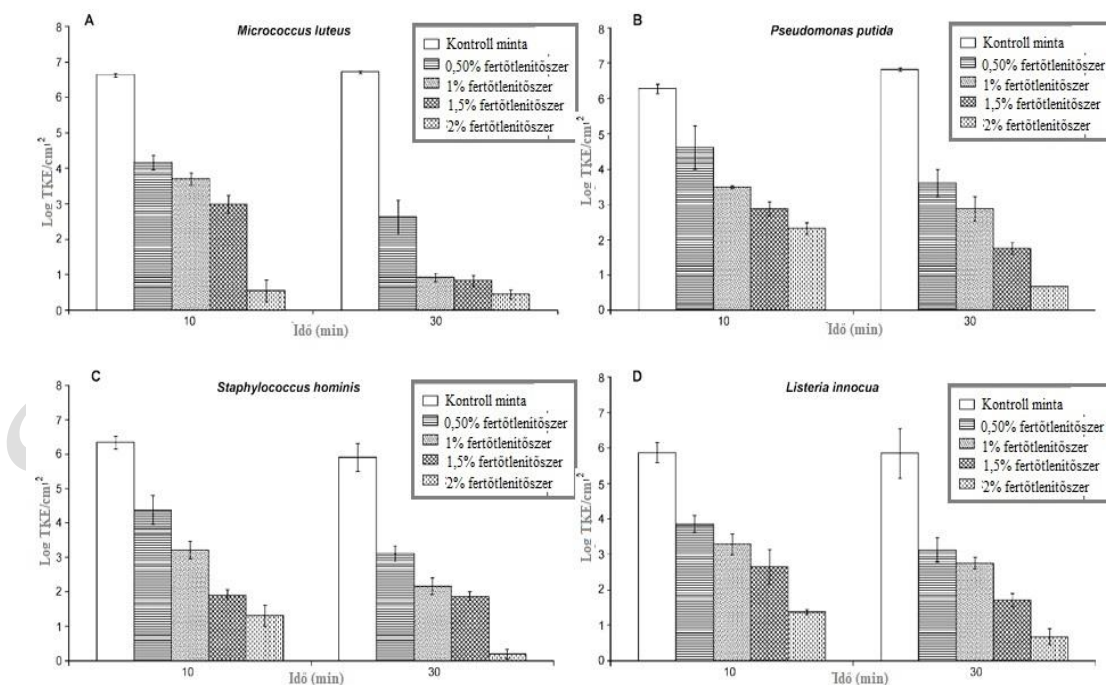
többrétegű biológiai filmet képezett a *M. luteus*, *P. putida*, *S. hominis* és a *L. innocua*, és hajlamos volt kolonizálni az acélfelület aktuális egyenetlenségeit és repedéseit.

12. ábra: SEM mikrofotók baktériumok által kialakított biofilmről rozsdamentes acél felületen: A - *Micrococcus luteus*, B - *Pseudomonas putida*, C - *Staphylococcus hominis*, D - *Listeria innocua*
(Forrás: Królasik et al., 2010)



Kísérletük második fázisában arra összpontosítottak, hogy megállapítsák, hogy mennyire állnak ellen a fertőtlenítőszernek a kísérletben szereplő fajok. A 13. ábrán látható, hogy a legnagyobb rezisztenciával a *P. putida* rendelkezik a többihez viszonyítva.

13. ábra: Fertőtlenítőszer hatása a *Micrococcus luteus* (A), *Pseudomonas putida* (B), *Staphylococcus hominis* (C) és *Listeria innocua* (D) által képzett biofilmrre a koncentráció és a kontaktidő függvényében.
(Forrás: Królasik et al., (2010) nyomán)



A tanulmányuk célja annak a tézisnek a megerősítése volt, hogy az adott termelési felületeken élő mikrobióta a helyesen elvégzett mosási és fertőtlenítési eljárások ellenére is ellenálló a fertőtlenítőszerekkel szemben, és ennek az ellenállásnak az alapja a mikroorganizmusok biofilmképző képessége (Królasik et al., 2010).

2.5.5. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* egy Gram-negatív, pálcá alakú (0.5-3.0 μm), obligát aerob, minimális tápanyagigényű baktérium (Iversen et al., 2007). Nem fermentatív baktérium, amely aerob körülmények között a glükóz lebontásához a glikolitikus útvonalat használja, végső elektronakceptorként oxigént használva. Anaerob körülmények között azonban a nitrogén is képes felhasználni (de Sousa et al., 2021). Nedves környezetben gyakran előfordul, és súlyos fertőzéseket okozhat legyengült immunrendszerű és érzékeny gazdaszervezeteiben. Számos járványkitörést hoztak összefüggésbe hibás vagy szennyezett orvosi berendezésekkel vagy készítményekkel, továbbá a kórházon belüli keresztszennyeződéssel (Iversen et al., 2007). A *P. aeruginosa* az emberek mellett az állatokat és a növényeket is képes megfertőzni. Ez a kórokozó virulenciafaktorok széles skálájával rendelkezik, ami lehetővé teszi számára, hogy károsítani tudja a gazdasejteket, valamint képes módosítani az emberi adaptív immunmechanizmusokat, ezáltal új fertőzések megjelenését okozza. Előfordulását tekintve mindenütt jelen lévő baktérium, amely mind a szárazföldi, mind a vízi ökoszisztémákban jelen van. Ennek következtében számos élelmiszerben, de kórházi környezetben is megtalálható. Emiatt nagy orvosi jelentőségű baktériumnak tekintik a különböző környezetekhez való nagyfokú alkalmazkodóképessége miatt, valamint képes krónikus fertőzést okozni a veszélyeztetett emberekben (de Sousa et al., 2021). A *P. aeruginosa* 4 – 42°C-ig terjedő hőmérséklet-tartományban képes túlélni, optimális a növekedéséhez a 37°C. Az izolátumok háromféle kolóniát hozhatnak létre. A 14. ábrán látható TSA agaron kifejlődött kolónia. A talajból vagy vízből származó természetes izolátumok jellemzően kis, durva kolóniát hoznak létre (Todar, 2004).

14. ábra: *Pseudomonas aeruginosa* TSA agaron
(Forrás: Internet I.)



A klinikai mintáknál kétféle kolónia létezik, az egyik típus tükrötojás-szerű, nagy, sima, lapos szélű és emelkedett megjelenésű. A másik típus, amelyet gyakran légúti és húgyúti váladékból nyernek, nyálkás megjelenésű, amit az alginát nyálka termelésének tulajdonítanak. A sima és nyálkás telepek feltételezhetően szerepet játszanak a kolonizációban és a virulenciában (Todar, 2004).

A *P. aeruginosa* nemcsak a természetes környezetben, hanem még az emberi gazdaszervezetben, például a krónikusan fertőzött CF-tüdő nyálkadugóin, szennyezett katétereken és kontaktlencséken képes biofilmet képezni (Häußler, 2004; Sharma et al., 2014). Emiatt a baktériumok nedves felületekhez és egymáshoz való kapcsolódási képessége, és az ezt követő, nagymértékben strukturált biofilmekké való differenciálódásuk fontos virulens tulajdonságnak tekinthető (Häußler, 2004). A biofilmképződésben fontos szerepet játszik a kvórumérzékelés (QS). Ez egy sejtek közötti jelzőrendszer, amelyben a baktériumok úgy kommunikálnak és szabályozzák a génexpressziót, hogy kis vegyületeket, úgynevezett autoinduktorokat bocsátanak ki a környezetbe. A *P. aeruginosa* esetében a kvórumérzékelés felelős a sejtsűrűségtől függő génexpresszióért (Sharma et al., 2014).

Mivel a biofilm életmódban élő baktériumok számos környezetben a baktériumtömeg jelentős részét alkotják, emiatt az ilyen bonyolult módon szervezett baktériumok megtelepedése egyre nagyobb figyelmet kap. Tekintettel a biofilm növekedési folyamat jelentős orvosi és gazdasági következményeire, nagy szükség van a kolonizációs folyamat megértésére annak érdekében, hogy megtaláljuk az azt befolyásoló módszert. A biofilm felépítése diszkrét és jól szabályozott lépések sorozatát igényli, és úgy tűnik, hogy a biofilm kialakulásának szakaszai a mikrobák széles körében konzerváltak (Häußler, 2004). A *Staphylococcus epidermidis* és a *Staphylococcus aureus*, valamint a *Pseudomonas aeruginosa* opportunista kórokozók a klinikailag legjelentősebb biofilmeket képző szervezetek közé tartoznak, és a Gram-pozitív, illetve Gram-negatív biofilmek tanulmányozásának modellorganizmusai lettek (Müsken et al., 2010).

2.5.6. *Acidovorax delafieldii*

Az *Acidovorax delafieldii* Gram-negatív, egyenes vagy enyhén ívelt pálca (0,2-1,2 x 0,8-5,0 µm) alakú, egyesével, párban vagy rövid láncokban előforduló baktérium. Egy, ritkán kettő vagy három poláris flagellával rendelkezik. Jellemző rá az aerob, szigorúan oxidatív típusú anyagcsere, ahol az oxigén a végső elektronakceptor. Emellett képes a nitrát heteotróf denitrifikációjára is. Oxidáz pozitív, képes litoautótróf módon növekedni, H₂ oxidációját

használva energiaforrásként. Jól növekszik szerves savakat, aminosavakat és peptont tartalmazó tápközegekben, de kevésbé tudja hasznosítani a különböző szénhidrátokat. Táptalajon a telepek sima, kerek vagy enyhén fodros, vagy szétterű pereműek. A telepek domborúak, sima vagy enyhén szemcsés, színük a béztől a halványsárgáig terjedhet (Willems et al.,2015).

Az *A. delafieldii* a talajokból, iszapokból, régi komposztokból és édesvízi forrásokból származó domináns mikroorganizmusok. Optimális növekedési hőmérséklete 30-35°C. (Willems et al.,2015).

A rézből készült vízvezetékek biofilmjeiből gyakran izolált heterotróf baktériumok közé tartoznak az *Acidovorax*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* és *Stenotrophomonas* fajok. Az *A. delafieldii* biofilmjeiben a szénhidrátkoncentráció növekedésével megfigyelt rézoldékonyság-növekedés a baktérium által termelt korróziós exopoliszacharidokkal való kölcsönhatásokból eredhet. Korábban kimutatták, hogy rézkorróziót idéz elő (Critchley et al., 2003).

Critchley és Fallowfield (2001) tanulmányukban azt vizsgálták, hogy az ivóvíz elosztórendszerekben a biofilmet alkotó baktériumok képesek-e megemelni a réz koncentrációját az ivóvízben. A kísérletek azt mutatták, hogy a baktériumok többsége (az izolátumok 83%-a) nem volt hatással a rézkoncentrációra a steril kontrollokhoz képest. Számos baktériumról (az izolátumok 14%-a) azonban kimutatták, hogy jelentősen növeli az ivóvíz rézkoncentrációját. Utóbbi csoporthoz tartozott az *Acidovorax delafieldii* a *Cytophaga johnsonae*, *Oligella* sp., *Rhodococcus fascians* és az *Micrococcus kristinae*. A rézkoncentrációt növelő baktériumokat nagyobb gyakorisággal izolálták a nagyvárosi csövekben. Megállapították, hogy az ivóvíz elosztórendszerekben előforduló magas rézkoncentrációk közvetlenül összefügghetnek a biofilmet alkotó baktériumok természetével és jelenlétével.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A vizsgálatokhoz használt tenyészetek

A munkám során a következő tenyészeteket használtam:

- Általam izolált tenyészetek: *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*
- Az Élelmiszer-mikrobiológia, higiénia és -biztonság Tanszék törzsgyűjteményéből való *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- Ivóvízből izolált *Acidovorax delafieldii*

A baktériumokat TSA táptalajon, hűtött körülmények között, illetve glicerín-TSB leves 1:2 arányú keverékben, -80 °C-on tartottam fenn.

- A kísérlethez 24 órás tenyészeteket készítettem.

3.2. A vizsgálatokhoz használt tápközegek

- TSB (Trypton-szója) leves
 - 1000 ml desztillált víz
 - 17 g pepton
 - 5 g szójaliszt
 - glükóz 2,50 g
- TSA (Trypton-szója) agar
 - 1000 ml desztillált víz
 - 15 g agar
 - 30 g TSA
- A hígítófolyadék összetétele:
 - 1000 ml desztilláltvíz
 - 8,5 g NaCl
 - 17 g pepton
 - 5 g szójaliszt
 - glükóz 2,50 g

- A különböző tápközegeket autoklávban 121 °C-on 15 percig steriliztem.

3.3. Mikroorganizmusok azonosítása különböző személyektől származó palackokról

Az azonosításhoz először is különböző személyektől kellett palackot szerezni, amelyből az illető elfogyasztotta az italát. Összesen 12 különböző személytől származó palackot sikerült összegyűjteni.

- I. Az üres palackok szájáról (a belső részről, illetve kívül a menetes részéről) mintavevő pálcával mintát vettem, amelyet egy hígítófolyadékba helyeztem.
- II. A hígítófolyadékból 1 ml-t pipettáztam TSA agarra és inkubáltam 2 napig.
- III. Az agaron kinőtt különböző telepekből műanyag oltókacs segítségével TSA agaron tiszta tenyészetet készítettem, majd 2 napig inkubáltam 37 °C-on.
- IV. Az így kapott tiszta tenyészeteket MALDI-TOF MS segítségével azonosítottam.

3.4. Biofilmképzés vizsgálata modell lemezeken

A *K. oxytoca*, *S. epidermidis*, *S. maltophilia*, *P. putida* baktériumok biofilm képzését követtem nyomon 50 x 50 mm méretű rozsdamentes acéllemezen és 65 x 25mm méretű polipropilén (PP) lemezen, volt. Egy vizsgálat 6 napig tartott, amelyben van egy 0. nap, 1. nap és 6. napon vettem mintát.

A rozsdamentes acéllemezek és a PP lemezek előkészítése:

- I. Üveg Petri csészékbe 9-9 db rozsdamentes acéllemezt, illetve polipropilén (PP) modell lemezt helyeztem.
- II. Ezután a Petri csészéket alufóliába becsomagoltam, majd autoklávbán sterilizáltam azokat.
- III. A steril lemezeket ezt követően lehet használni a kísérlethez.

A kísérlet lépései:

- I. A kísérlethez 24 órás tiszta tenyészetet használtam. Az OD mérő segítségével 10^8 sejt/ml koncentrációjú mikrobaszuszpenziót készítettem.
- II. Négyzet alakú nagyobb méretű Petri csészékbe 70 ml TSB-t mértem ki steril mérőhengerrel.
- III. Az elkészített mikrobaszuszpenzióból 0,7 ml-t pipettáztam a TSB leveshez.
- IV. Egy csipeszt alkoholba mártottam, majd lelángoltam, hogy steril legyen. A csipesszel ezt követően a steril modell lemezeket a mikrobaszuszpenzióval beoltott TSB levesbe helyeztem.

- V. Egy órát hagytam állni a levesben a lemezeket.
- VI. Steril csipesszel óvatosan kiemeltem egyenként a lemezeket és oldalanként 5-5 ml steril vízzel leöblítettem, hogy az irreverzibilisen kötődő sejtek lemosódjanak.
- VII. A letisztított lemezek közül hármat félretettem, hogy a lemezek kiindulási mikrobakonzentrációját meg tudjam állapítani (0. nap). A többi lemezt steril TSB levesbe helyeztem és 30 °C-on inkubáltam az 1., illetve a 6. napi mintavételig.
- VIII. A 0. napon a lemezek felületéről mintavevő pálca segítségével mintát vettem, majd hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe helyeztem és a megfelelő tagból álló hígítási sort készítettem. A hígítási sor 3 tagjából lemezöntést végeztem TSA agarral, majd 2 napig inkubáltam a lemezeket és meghatároztam a sejtszámot.
- IX. Az 1. és 6. napon a lemezek 5-5ml steril vízzel való öblítését követően a VIII. lépésnek megfelelően jártam el.

3.5. Palack belső felületén képződő biofilm és eltávolíthatóságának vizsgálata

A kísérlet során steril csapvízzel feltöltött rozsdamentes palackokban kísértem végig az *Acidovorax delafieldii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Pseudomonas putida* mikroorganizmusok szaporodását és az általuk létrehozott biofilmek képződését 6 napon keresztül.

A kísérlet célja volt továbbá, hogy felmérjem a háztartásban alkalmazott tisztítási módszerek hatékonyságát a biofilmek eltávolítására vonatkozóan. Az összehasonlításban az általános háztartási mosógatószeres öblítést, illetve a mosógatószer és palacktisztító kefe együttes alkalmazását szerettem volna összevetni. A módszer során az élősejtszám meghatározásához TSA agart és hígítófolyadékot alkalmaztam.

3.5.1. A rozsdamentes palackok előkészítése:

- I. Tiszta palackokba mérőhenger segítségével 500 ml csapvizet öntöttem, majd autoklávban sterilizáltam a palackokat.

3.5.2. Biofilmképződés vizsgálata rozsdamentes palackban

- I. OD mérővel a sejtszuszpenzió koncentrációját 10^8 sejt/ml-re állítottam be az adott mikrobánál. Ezt követően hígítási tagot készítettem úgy, hogy 10^5 sejt/ml legyen a szuszpenzió koncentrációja. Az így kapott hígítási tagból 0,5-0,5 ml-t pipettáztam egyenként a palackokban levő steril csapvízhez (előkészített palackok), így a kiindulási koncentráció nagyságrendileg 10^2 sejt/ml lett.
- II. A palackokat ezután óvatosan összeráztam, hogy a belepipettázott szuszpenzió egyenletesen eloszlassam a folyadékban.
- III. A palackokat szobahőmérsékleten tároltam.
- IV. A kísérlet során a 0., 1., és 6. napokon vettem mintát a vízből és a palack belső felületéről a mikrobaszám meghatározása érdekében. Ehhez az alábbiak szerint jártam el: A palackokat először alaposan összeráztam, hogy az irreverzibilisen kötődő sejteket eltávolítsam. Az adott naptól függően 3 palackban található vízből, illetve annak megfelelő tagú hígításaiból 1 ml -t pipettáztam a Petri csészékbe és TSA agar segítségével lemezöntést végeztem. Ezt követően a vizet óvatosan kiöntöttem, majd steril mintavevő tampon segítségével a palackok teljes belső felületéről mintát vettem. A tamponokat ezt követően hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe helyeztem és alaposan vortexeltem a kémcsöveket (30 másodperc). Hígítási sor készítését követően lemezöntést végeztem TSA agarral a hígítási sor megfelelő tagjaiból. A lemezeket ezután 2 napig a vizsgált mikrobától függően 30°C vagy 37°C -on inkubáltam, majd megállapítottam a vízben és a palack belső felületén levő sejtkoncentrációt.

3.5.3. Biofilm eltávolíthatóságának vizsgálata háztartásban alkalmazott tisztítási módszer segítségével

- I. A 3.5.2 fejezetben leírt módnak megfelelően készítettem elő a rozsdamentes palackokat a IV-ik lépésig. A meghatározott napokon, azaz szintén a 0., 1., és 6. napon végeztem 3-3 palack esetében kétféle tisztítási eljárást. Ennek az eredményeit ugyanúgy élősejtszám meghatározási módszerrel határoztam meg.
- II. A tisztítás az alábbiak alapján történt: a meghatározott mintavételi napon a vizet kiöntöttem a 3-3 palackból, majd ezt követően végeztem el a tisztítási eljárást.
 - i. *Öblítéssel történő tisztítás:* ennél az eljárásnál 100-100 ml mosogatószeres steril csapvizet mértem ki steril mérőhengerbe, majd az üres palackokba öntöttem és rázogatóással átmostam azokat.

- ii. *Súrolásos tisztítás*: ennél a tisztítási eljárásnál is 100-100 ml mosogatószeres steril csapvizet mértem ki steril mérőhengerrel és öntöttem a palackokba. Ezt követően felületi fertőtlenítőszerrel kezelt műanyag palackmosó kefével súroltam át a palackok belső felületét.
- III. A tisztítási lépést követően mind a kettő tisztítási módszer esetben 2 x 100 ml steril csapvízzel öblítettem át a palackokat, hogy a keletkezett mosogatószeres habot eltávolítsam.
- IV. Steril mintavevő tampon segítségével a palackok teljes belső felületéről mintát vettem. A tamponokat ezt követően hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe helyeztem és alaposan vortexeltem a kémcsöveket (30 másodperc). Hígítási sor készítését követően lemezöntést végeztem TSA agarral a hígítási sor megfelelő tagjaiból. A lemezeket ezután 2 napig a vizsgált mikrobától függően 30°C vagy 37°C -on inkubáltam, majd megállapítottam a vízben és a palack belső felületén levő sejtkoncentrációt.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

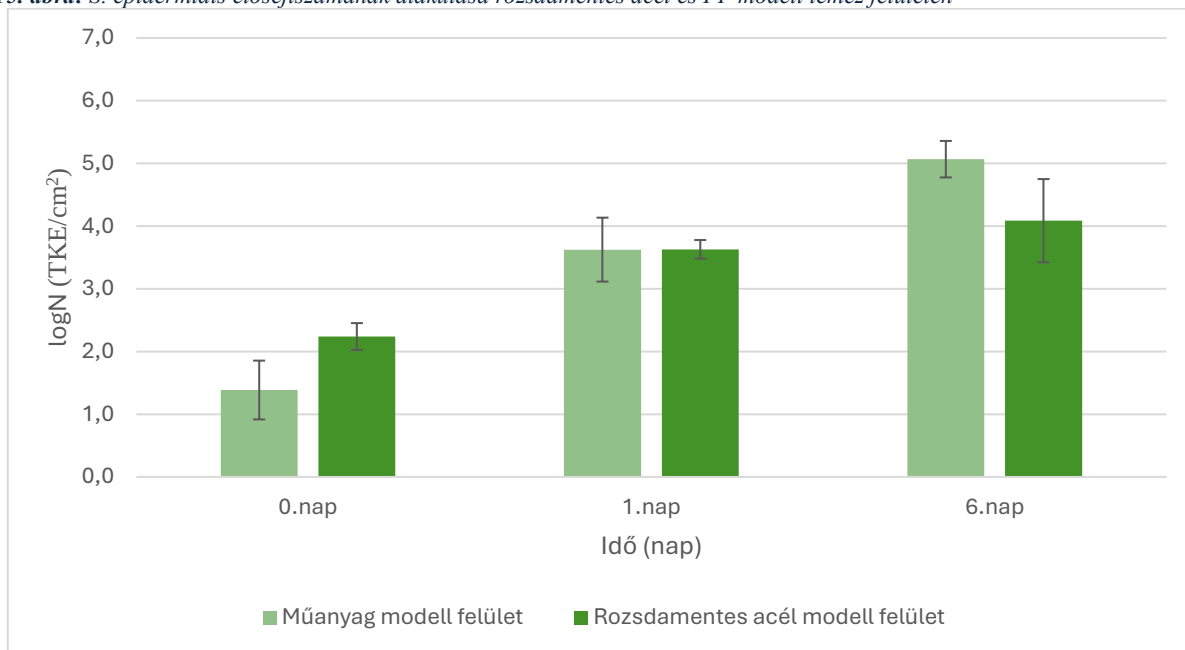
4.1. A palackok szájáról izolált mikroorganizmusok azonosításának eredményei

Az M1. táblázatban a mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizációs repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometriával (MALDI-TOF MS) 31 izolátumból 25 azonosítása volt lehetséges különböző megbízhatóság mellett: nagy valószínűségű fajazonosítás (2,3 score érték felett) 5 esetben, biztos nemzetség azonosítás és valószínű fajazonosítás (2,0 és 2,29 érték között) 17 esetben, valószínű nemzetség azonosítás (1,7 és 1,99 érték között) 5 esetben. A minták között többször előfordult, hogy ugyanazt a mikroorganizmust sikerült beazonosítani, ilyen volt a *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Brevundimonas diminuta*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Az is megfigyelhető volt, hogy egy nemzetségből több fajt is sikerült azonosítani. Az *Acinetobacter* nemzetségen belül megtalálható volt három faj: *A. johnsonii*, *A. beijerinckii*, *A. ursingii*. A *Microbacterium* nemzetség esetén a *M. maritipicum* és a *M. hatanonis*, szintén két faj lett azonosítva a *Staphylococcus* nemzetségen belül, az *S. saprophyticus* és a *S. epidermidis*. A kapott eredmények alapján 4 sikeresen azonosított organizmust szakirodalmi kutatás után választottam ki a kísérletekhez. Fontos még azt is megemlíteni, hogy ez a 31 izolátum néhány embernek a palackjáról sikerült azonosítani, de mivel a bolygón több, mint 7 milliárd ember van, számtalan más ismert és még ismeretlen mikroorganizmus található a szájban. Ezzel pedig egyidejűleg a palack belsejébe olyan mikroorganizmusok is bekerülhetnek, amelyekről még nincs megfelelő információ (túlélés, szaporodás, biofilmképzés) (Burcham et al., 2020).

4.2. A biofilmképzés modell felületeken

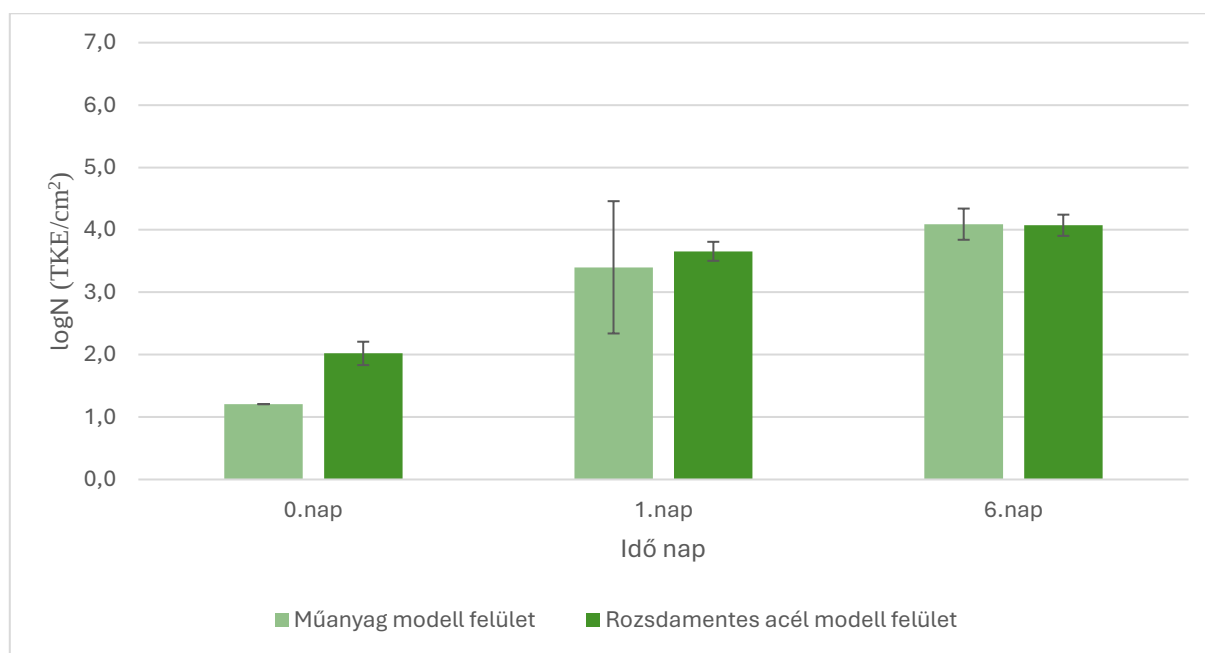
A 15. ábrán az *S. epidermidis* sejtkoncentrációja látható a rozsdamentes acél -és műanyag modell felületen. Megfigyelhető, hogy már a 0. napon a rozsdamentes modell lemez felületéről 2,2 logN (TKE/cm²) sejtkoncentrációt sikerült kimutatni, majd ez az érték az 1. napra több, mint a másfélszeresére növekedett. A 6. napon 0,5 logN (TKE/cm²) értékkel növekedett az 1. napon kapott eredményhez képest. A műanyag felületen a 0. napon kisebb sejtkoncentráció volt kimutatható, azonban az 1. napra ugyanazt a sejtkoncentrációt elérte, mint a rozsdamentes felületen. Ez majdnem a 0. napi érték kétszerese. A 6. napra pedig elérte az 5 logN (TKE/cm²) értéket. Összehasonlítva a két felületet elmondható, hogy mind a kettő anyagon az *S. epidermidis* biofilmet képzett, azonban a műanyagon nagyobb szaporodási intenzitás volt kimutatható a 6. napra. Ez egy nagyságrendnyi sejtkoncentráció különbséget jelent.

15. ábra: *S. epidermidis* élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél és PP modell lemez felületén



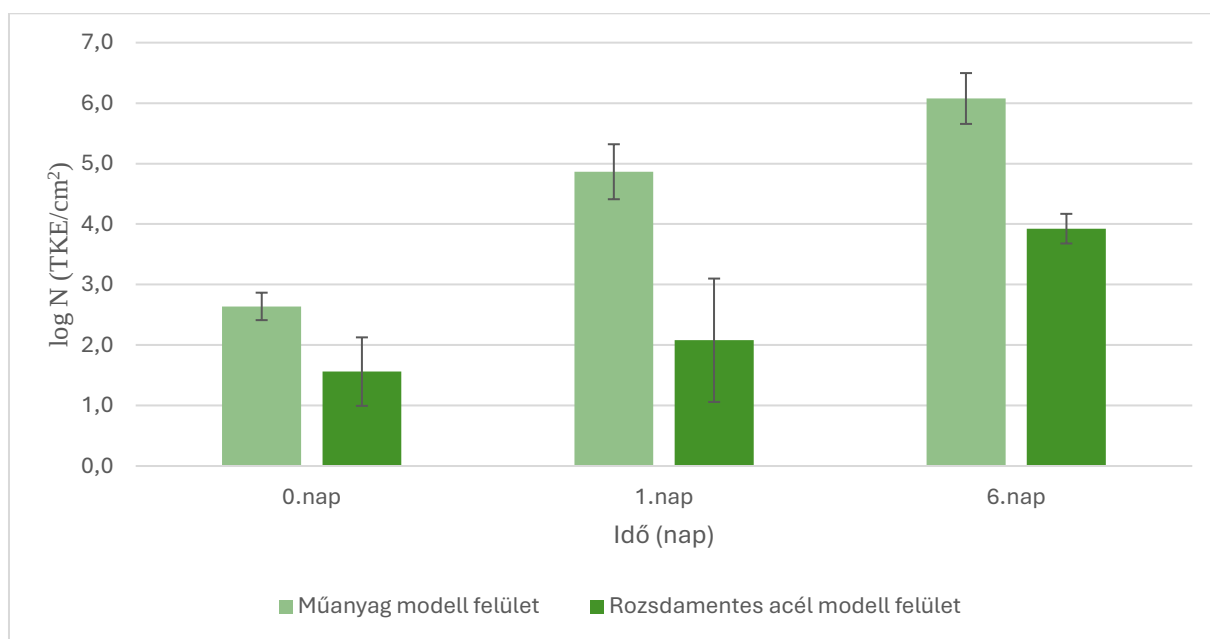
A 16. ábrán a *K. oxytoca* sejtkoncentrációjának alakulását lehet nyomon követni a két felületen. A rozsdamentes acél modell felületen a 0. napon 2,0 logN (TKE/cm²) volt a kiindulási sejtkoncentráció, amely az 1. napon közel a duplájára növekedett. Az 1. napi mintavételt követő 5 nap alatt további 0,4 logN értékkel növekedett a kimutatható sejtkoncentráció. A műanyag modell felületen a 0. napon kezdetben kevesebb sejt tudott megtapadni (1,2 logN (TKE/cm²), azonban az 1. napra ennél a mikrobánál is sejtkoncentrációját, hogy megnövekedett (közel háromszorosa lett) a sejtkoncentrációját. A 6. napra az *S. epidermidis*-hez hasonlóan csökkent a baktérium szaporodásának intenzitása, de így is egy nagyságrenddel nőtt a kimutatható sejtek koncentrációja. Ilyen módon a rozsdamentes acél felülettel megegyező sejtkoncentrációt ért el a vizsgálat utolsó napján. Mind a két felületen tudott a *K. oxytoca* biofilmet képezni, és már az első napon sikerült megtapadnia a felületen. A legnagyobb léptékű növekedés a 0. napról az 1. napra történt a műanyag -és a rozsdamentes felület esetében is. A *K. oxytoca* műanyagon való jó biofilmképző tulajdonságáról már egy korábbi kutatásban is beszámoltak (Abood és Ibrahim, 2017).

16. ábra: *K. oxytoca* élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél és PP modell lemez felületén



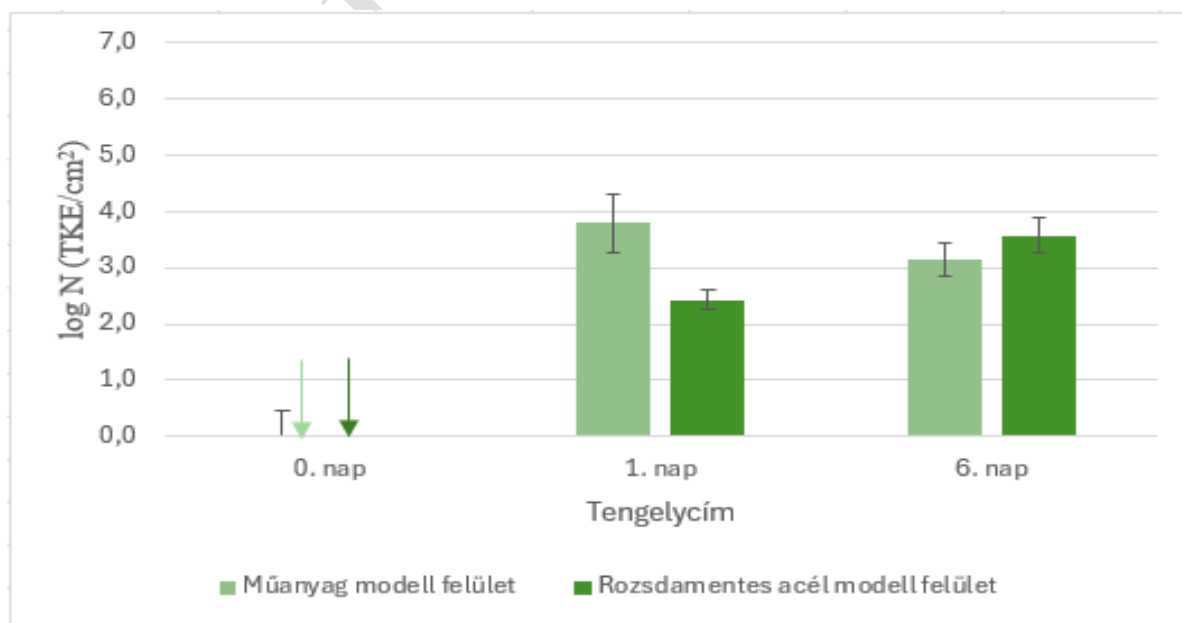
A *S. maltophilia* élősejtszámának alakulását a két modell felületen a 17. ábra szemlélteti. A műanyag lemezen az 0. napon 2,6 logN (TKE/cm²) volt a kimutatható sejtkoncentráció. Egy nap alatt ebben az esetben is a kezdeti sejtkoncentráció majdnem a kétszeresére nőtt. A 6. napra is tovább nőtt a biofilmet alkotó baktériumok koncentrációja és meghaladta a 6 logN (TKE/cm²)-t, így az 1. naphoz képest még két nagyságrenddel növekedett. A 0. napon 1,6 logN (TKE/cm²) volt a kiindulási sejtkoncentráció a rozsdamentes acéllemezen, ami az 1. napra 2,1 logN (TKE/cm²) értékig emelkedett. Az 1. naphoz képest a 6. napra két nagyságrenddel növekedett. A két felület között itt már némi különbség volt tapasztalható. A *S. maltophilia* számára a műanyag felület kedvezőbbnek bizonyult a biofilmképzés szempontjából, de a rozsdamentes acél felületen is képes volt fokozatosan növekedni.

17. ábra: *S. maltophilia* élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél és PP modell lemez felületén



A műanyag -és rozsdamentes acél modell felületen a *P. putida* sejtkoncentrációjának alakulását a 18. ábra követi nyomon. Mind a két felület esetén a 0. napon nem volt kimutatható a *P. putida*. Az 1. napon a műanyag felületen intenzívebb szaporodást tapasztaltam három nagyságrenddel is nőtt a sejtkoncentráció azonban ezt követően már nem volt jelentős változás a biofilmet alkotó baktériumok mennyiségében. A rozsdamentes acél felületen is hasonló tendenciát tapasztaltam. Ennél a baktériumnál is megfigyelhető volt, hogy a két felületen azonos mértékben képzett biofilmet.

18. ábra: *P. putida* élősejtszámának alakulása rozsdamentes modell lemez felületén

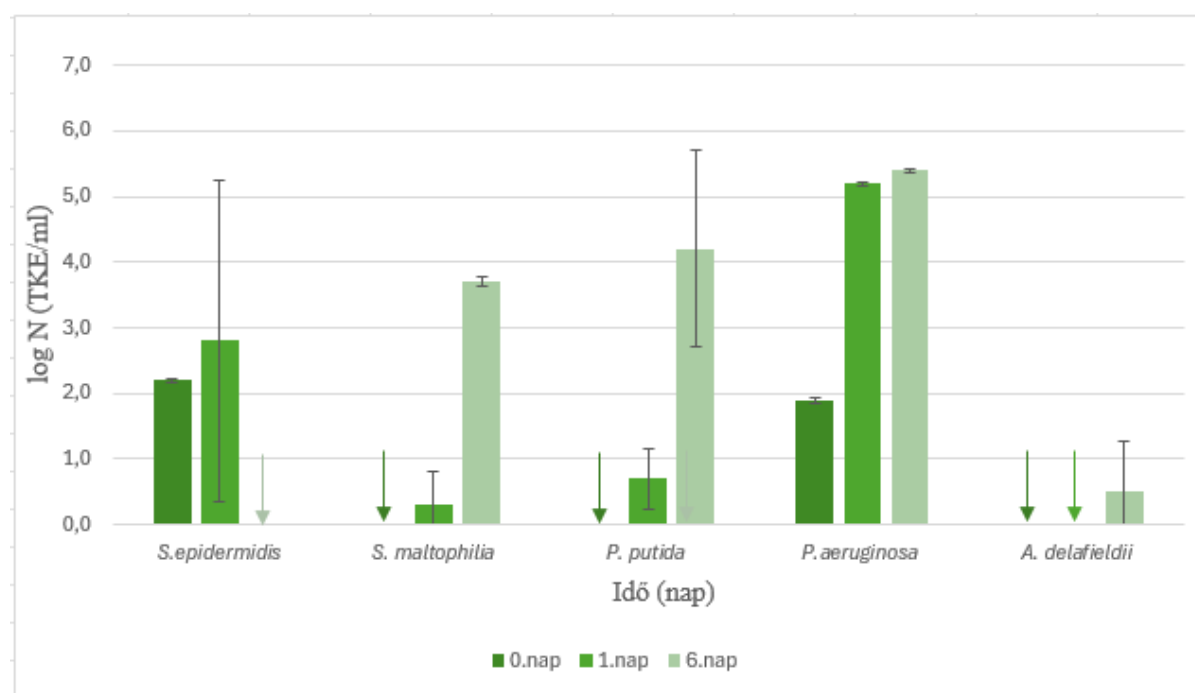


A 15-18. ábrán levő eredményeket a kísérletek utolsó napján összehasonlítva megállapítható, hogy mindegyik mikroorganizmus képes volt biofilmet kialakítani a műanyagon és a rozsdamentes acél felületen is. Az *P. putida* kivételével az összes mikroba sejtkoncentrációja fokozatosan növekedett mindkét felületen a kísérlet ideje során. A legintenzívebb biofilmképződést a *S. maltophilia* mutatott műanyag modell felületen. A *P. putida* esetében tapasztaltam a legkisebb mértékű biofilmképződést a rozsdamentes acél felületen. A *K. oxytoca*, *S. epidermidis* azonos léptékben növekedett mind a két felületen. Ehhez a két mikrobához hasonlítva a *P. putida* és *S. maltophilia* rozsdamentes acél modell felületen hasonló sejtkoncentrációt ért el a 6.napra.

4.3. Biofilmképzés rozsdamentes acél palackban

A 19. ábrán a vizsgált baktériumok élősejtszámának alakulása látható, amely a palackban tárolt vízből származott. Az *S. epidermidis* a 0. napon 2,2 logN (TKE/ml) sejtkoncentráció értéket mutatott a vízben, így ezen a napon ez bizonyult a legnagyobb koncentrációnak a többi mikrobához képest. Egy napos tárolást követően enyhén növekedett a sejtkoncentráció, majd 6. napra a kimutatási határ alá csökkent, ami csak ennél a baktériumnál volt megfigyelhető. A meglepő eredmény miatt a kísérlet újbóli megismétlésére lenne szükség. A *S. maltophilia*, *P. putida* és az *A. delafieldii* mikrobák esetén a 0. napon a kimutatási határ alatt volt az élősejtszám. Az *A. delafieldii* esetén ez még az 1. napon is így maradt. Az 1. napra a *S. maltophilia* és *P. putida* sejtkoncentrációja alig haladta meg a kimutatási határt. Kijelenthető, hogy ennek a két mikrobának sikerült a legnagyobb koncentrációnövekedést elérnie az 1. napról a 6. napra. A *P. aeruginosa* érte el a legnagyobb élősejtszámot a vízben a 6. napon. Ez a mikroba a többihez képest más tendenciával szaporodott. A 0. napról az 1. napra történt meg az intenzív sejtkoncentráció növekedés, majd az 1. napról a 6. napra csak 0,2 logN (TKE/ml) -vel emelkedett. Összegezve a vizsgált mikroorganizmusok közül a *P. aeruginosa*-hoz, mint modell biofilmképző mikrobához hasonlítva az *S. maltophilia* és a *P. putida* mutatott hasonló tendenciájú, de kisebb intenzitású szaporodást a fém palackban tárolt vízben. Ezzel szemben *S. epidermidis* csak a kísérlet kezdetén tudott szaporodni. Az *A. delafieldii* pedig nagyon lassú és kis intenzitású szaporodást mutatott.

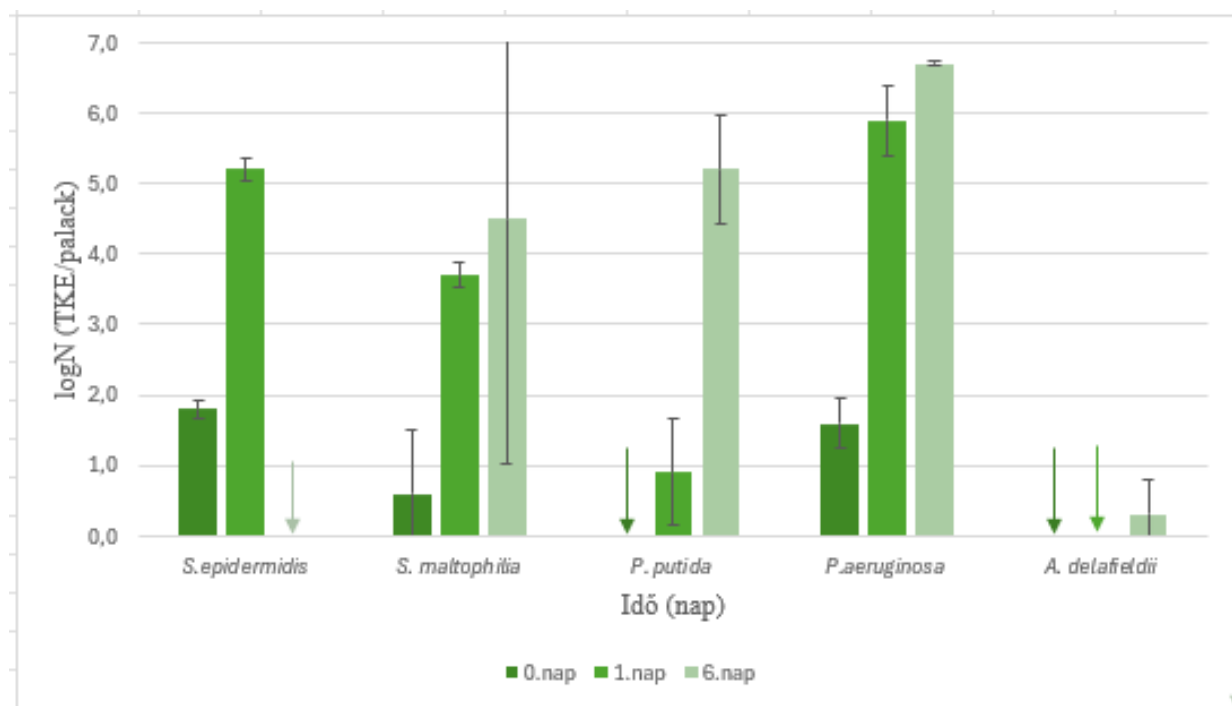
19. ábra: Vizsgált baktériumok élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél palackban tárolt vízben



A 20. ábrán a rozsdamentes acél palackok belső felületén kialakult biofilm élősejtszám meghatározásnak az eredménye látható. A *S. epidermidis*-nek a 0. napon 1,8 logN (TKE/cm²) volt a kiindulási sejtkoncentrációja, az 1. napra azonban hirtelen növekedésnek indult és elérte az 5,2 logN (TKE/cm²) koncentrációt, ami négy nagyságrendnyi változást jelent. A 6. napra azonban a kezdeti intenzív sejtkoncentráció növekedés megállt, sőt a sejtek elpusztultak, így a kimutatási határ alá csökkent az élősejtszám. A *S. maltophilia* felületen a kezdeti sejtkoncentrációja 0,6 logN (TKE/cm²), amely ezt követően az 1. napon három nagyságrend növekedést ért el, majd a tárolás során tovább növekedett, de már csak kisebb mértékben. A *P. putida* a 0. napon az *A. delafieldii* sejtkoncentráció értékei a 0. és 1. napon a kimutatási szint alatt voltak. Az *A. delafieldii* a 6. napra 0,3 logN (TKE/cm²) sejtkoncentrációt ért el. A *P. putida* az 1. napról a 6. napra öt nagyságrendnyi sejtkoncentráció növekedést tapasztaltam. A *P. aeruginosa* sejtkoncentrációja a kísérlet elején egy nap alatt négy nagyságrendnyit emelkedett. Ez a kezdeti intenzív növekedés a kísérlet elkövetkező 5 napja alatt alább hagyott és csak további egy nagyságrenddel nőtt. Összességében azt tapasztaltam, hogy a *Ps. aeruginosa*-hoz hasonlóan, de kisebb mértékben, két szájüreg eredetű baktérium (*S. maltophilia* és *P. putida*) alakított ki biofilmet a fém palack belső felületén. A *S. epidermidis* biofilm képzésének megállapításához ismételt kísérlet lenne szükséges. Az *A. delafieldii* biofilm képzése a műanyag palackokban tapasztaltakhoz képest (Dancs, 2020) jelentéktelen mértékben volt jelen. A három

felület közül a PP felület volt a legideálisabb a biofilm kialakulásához. A PET palackon közepes mértékben tudott biofilmet kialakítani.

20. ábra: Vizsgált baktériumok élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél palack belső felületén

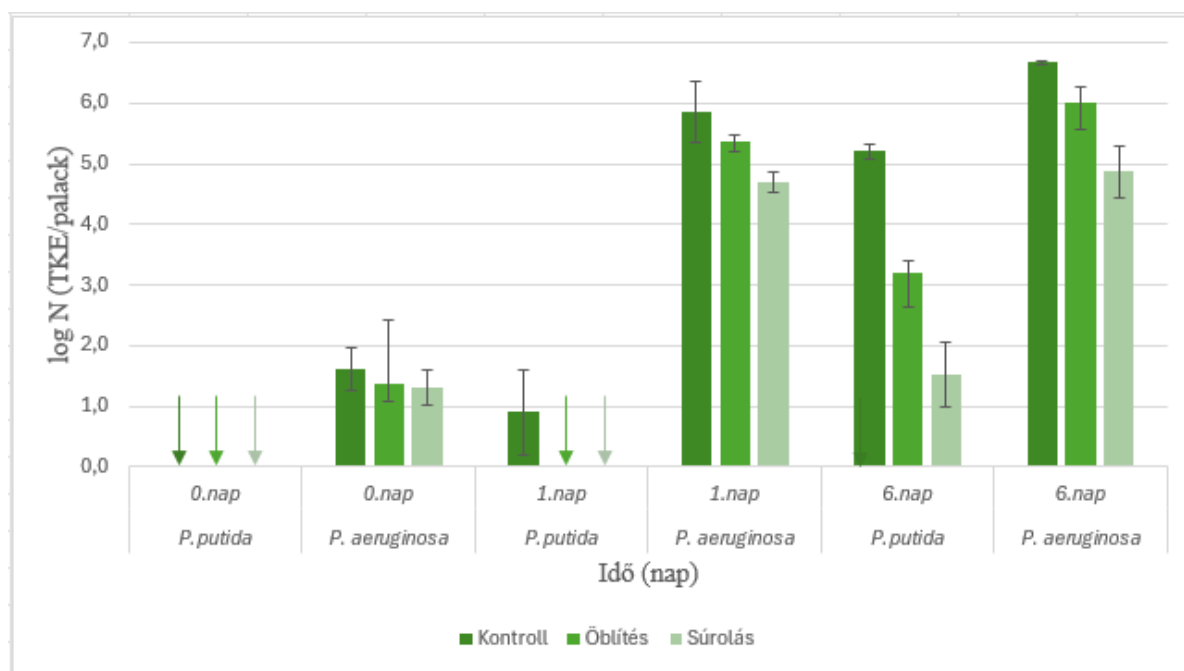


4.4. Tisztítási kísérlet eredményei

A 21. ábra a *P. putida*-val, illetve a *P. aeruginosa*-val beoltott palackokkal végzett tisztítási kísérletek eredményeit szemlélteti. Az 0. napon a két mikroba között különbség látható. A *P. putida* esetén a sejtkoncentráció értékei a kimutatási határ alatt voltak, így nem lehet különbséget tenni a tisztítási módszerek hatékonysága között. A *P. aeruginosa*-nak az 0. napon a kontroll mérésnek az értéke 10^1 TKE/cm² volt, a súrolásos és öblítéses módszerrel végzett tisztítás azonban csak 0,2-0,3 logN (TKE/cm²) értékkel tudta csökkenteni a palack felületére tapadt sejtek koncentrációját. A kísérlet 1. napján a *P. putida* kontroll sejtkoncentráció 0,9 logN (TKE/cm²) volt, amit sikerült lecsökkenteni mind a két tisztítási módszerrel a kimutatási határ alá. A 6. napra a kontroll értéke 5,2 logN (TKE/cm²) értékig növekedett, amelyet a súrolásos módszer végül négy nagyságrenddel tudott csökkenteni. Az öblítéses módszer azonban csak két nagyságrendet tudott rajta csökkenteni. A *P. aeruginosa* esetén az 1. napon a kontroll sejtkoncentrációja intenzíven nőtt és elérte az 5,9 logN (TKE/cm²) -t. Ennél a mikrobánál, ahhoz képest milyen magas volt a kiindulási koncentráció, nem sikerült kellő képpen csökkenteni az élősejtszámot. Az öblítésnél 0,5 logN (TKE/cm²) csökkentést sikerült elérni, a súrolásnál 1,2 logN (TKE/cm²) -t. A 6. napon a súrolásos módszerrel két nagyságrendet sikerült csökkenteni a kontrollhoz képest, az öblítésnél ugyanúgy maradt az 1 logN (TKE/cm²)

sejtkoncentráció csökkenés. A két módszert összehasonlítva kijelenthető, hogy a súrolásos módszer mindkét baktérium esetében hatékonyabb az öblítésnél. Az eltávolítás hatékonyságát tekintve a *P. putida* által képzett biofilm érzékenyebbnek bizonyult a tisztítási módszerekkel szemben.

21. ábra: *P. putida* és *P. aeruginosa* élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél palack belső felületén - tisztítási kísérlet



5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A rozsdamentes acél -és műanyag modell felületeken a szájból izolált mikrobák képesek voltak a szaporodni és biofilmet képezni. Tehát egyik felület sem volt antimikrobális hatással arra, hogy ne képződjön rajta biofilm. Azonban a két felület között abban volt különbség, hogy milyen mértékben sikerült az egyes mikrobáknak biofilmet képezniük. Elmondható, hogy a műanyag felületen két mikrobánál (*S. maltophilia*, *S. epidermidis*) nagyobb volt a sejtkoncentráció a 6. napra, mint a rozsdamentes acél felület esetén. Ezáltal a műanyag felület alkalmasabb volt a mikrobáknak a biofilm képződésére. Ez azzal magyarázható, hogy a műanyag felülete érdes, nem sima a kialakítása, amely lehetővé teszi a sejtek könnyebb megtapadását. A rozsdamentes acél felület egy esetben volt kedvezőbb a biofilm növekedésének a műanyaggal szemben, az pedig a *P. putida*-nál volt megfigyelhető. A *K. oxytoca* biofilmképző tulajdonsága megegyezett a két felületen és a 6.napra azonos nagyságú sejtkoncentrációt ért. A mikrobáknál megfigyelhető a különböző mértékű és intenzitású sejtkoncentráció növekedés. A *P. putida* a 0. napon nem volt képes megtapadni egyik felületen sem, hanem az 1. napra sikerült a felülethez kötődnie. Elmondható, hogy a kezdeti lassú növekedés ellenére a 0. -és 1. nap között intenzív növekedésnek indult, amely valószínűleg annak volt köszönhető, hogy nehezebben alkalmazkodik a környezeti hatásokhoz. Emiatt hosszabb időre volt szükség a megtapadásra, és a sejteknek adaptálódniuk kellett a környezethez, ami a rozsdamentes acél felület esetén megvalósult a 6. napig, de a műanyag esetében ez nem mondható el. A mikrobáknál megfigyelhető volt az is, hogy a legnagyobb nagyságrendnyi változás a 0. és 1. nap között történt, kivéve a *S. maltophilia*-nál a rozsdamentes felületen. A későbbi palackkal végzett vizsgálatok eredményeit figyelembevéve megállapítható, hogy a modell lemezekkel végzett kísérletek több esetben hasznos információt nyújtottak a palackokban kialakuló a biofilmképződés előrejelzéséhez. Emiatt a továbbiakban lehetne még más típusú anyagokon is elvégezni a vizsgálatokat, illetve a kísérlet hosszán is lehetne változtatni. A mikrobák különböző tulajdonságainak, környezeti alkalmazkodásuknak a révén más-más szaporodási tendenciával rendelkeztek, így a 6. napra 10^3 - 10^6 TKE/cm² nagyságrendig növekedtek. Ez a nagyságrend már jelenthet fertőzési kockázatot amennyiben a szervezet immunrendszere legyengült (Fernández, 2015; Tang et al., 2020). A műanyag -és rozsdamentes acél felület eredményeit összehasonlítva nem jelenthető ki az a tény, hogy a rozsdamentes acél felület használata biztonságosabb a biofilmek ellen, azonban a biofilm sejtkoncentrációja kisebb értékeket mutat (10^3 - 10^4 TKE/cm²), mint a műanyag esetén (10^3 - 10^6 TKE/cm²).

A rozsdamentes acél palackok belső felületéről kapott eredményei változatosabb képet mutattak a modell acél felülethez képest. A *S. epidermidis* esetén szembetűnő volt a különbség. A modell kísérletben a 6. napra 10^4 TKE/cm²-ig emelkedett a sejtkoncentráció, addig a palack esetén a kimutatási határ alá csökkent a sejtszám. Ez magyarázható azzal, hogy más volt a tápközeg, emiatt a palackban levő víz tápanyagszegény környezetet jelentett a *S. epidermidis* számára, amely hosszú távon nem alkalmas a mikroba túléléséhez, de egyben felveti a kísérlet megismétlésének szükségességét. A *S. maltophilia* mind a modell mind a palackos kísérletben képes volt biofilmet képezni. A szaporodás mértékében volt némi különbség. A *P. putida* a *S. maltophilia*-hoz hasonlóan mind a modell és palack belső felületén képes volt biofilmet kialakítani, azonban a palack felületén nagyobb sejtkoncentrációjú biofilm képződött a 6. napra.

A *P. aeruginosa* és *A. delafieldii*-t egy korábbi PP és PET palackkal végzett kísérlet eredményeivel (Dancs, 2020) összevetve a rozsdamentes palack kísérletek eredményeivel, elmondható, hogy a *P. aeruginosa* sejtkoncentrációja a 6. napra mind a három felületen 10^6 TKE/palack nagyságrendben volt kimutatható. Azonban a 0. és 1. nap között még különbségek voltak felfedezhetőek. A rozsdamentes acél felület esetén már kezdetben nagyobb volt a megtapadás, ezzel szemben a műanyag felületek esetén a kimutatási határ alattiak voltak a sejtkoncentráció értékek, és a kísérlet kezdetén egy nap alatt négy nagyságrendet nöött. A 6. napig a műanyagon nagyobb nagyságrendnyi változás volt tapasztalható. Ez a mikroba mind a három típusú anyag esetén stabil biofilmet képzett. A biofilmképződés megakadályozására fontos lenne, hogy minden nap tisztítva legyen a palackok, mivel ekkor még kis sejtkoncentrációban vannak jelen a mikrobák. Az *A. delafieldii* a rozsdamentes acél felületen elhanyagolható mértékben fejlődött, addig a PP felületen tudott a legjobban biofilmet képezni. A PET anyagú felületen kezdetben megindult a sejtszaporodás, de a 6. napra lecsökkent, amely révén megállapítható, hogy a PET és a rozsdamentes acél felület nem kedvez a mikrobának biofilm képződésének. A következtetésképpen a rozsdamentes palack biztonságosabb választás lehet a PET és PP-hez képest, amennyiben éppen azon gondolkozunk, hogy legközelebb milyen típusú palackra ruházzunk be. Ezen kívül még további kísérletet lehetne végezni például üvegből készült palackkal is, hogy ahhoz is legyen viszonyítási alap.

A modell és a palack kísérlet eredményeiben azért lehettek eltérések, mert különbözhetett a felületek simasága, kialakítása, érdessége, ami által máshogy tudnak megtapadni a mikroorganizmusok. Tabaco és munkatársai (2018) viszonyították egymáshoz a rozsdamentes acélból és műanyagból készült palackok tulajdonságait. Megállapították, hogy a rozsdamentes acél a legideálisabb anyag, mert tartós, nem repedezik és könnyebben tisztítható, kevésbé

porózus, mint a műanyag. A másik tényező az lehetett, hogy a modell kísérlet esetében a folyadék közeg TSB volt, amelyet más időbeli lefolyással hasznosítottak, mint a palack esetében a steril csapvizet. Emiatt lehetett az, hogy a modell kísérlet esetén az 1. napra nagyobb nagyságrendnyi növekedés volt megfigyelhető, mivel gyorsabban tudták hasznosítani a benne található tápanyagokat, míg a palack kísérletnél pedig a vízben levő tápanyagok felhasználásához több időre volt szükségük.

A vizsgált mikrobák közül az *A. delafieldii*, *S. epidermidis* nem képzett a 6. napra jelentős biofilmet, viszont a másik három mikroba képes 10^4 - 10^6 TKE/palack sejtkoncentrációjú biofilmet létrehozni, így felmerülhet a kérdés, hogy tovább tárolva mennyi ideig életképesek és milyen mértékben képesek még tovább növekedni, amennyiben nincs rendszeresen tisztítva a palack.

A tisztítási kísérlet eredményei kedvezőnek bizonyultak, bár nagyobb hatékonyságra számítottam a tisztítási módszerekkel kapcsolatban. Mind a kettő vizsgált mikroba esetén a súrolásos technika bizonyult a leghatékonyabb tisztítási módnak. A *P. putida*-nál volt megfigyelhető a leghatékonyabb tisztítás, ahol is a 6. napon négy nagyságrendnyi csökkenést sikerült előidézni. Az öblítéses módszer sem elhanyagolható ennél a mikrobánál, de kisebb hatékonyságúnak bizonyult. A *P. aeruginosa* eltávolítása nehezebbnek bizonyult, mivel a súrolásos módszerrel csak két nagyságrendnyi csökkenés volt elérhető. Valószínűsíthető, hogy a *P. aeruginosa* jobb tapadási tulajdonsággal rendelkezik, emiatt kevésnek bizonyult a súrolásos technika. Fontos a mikrobák különböző tulajdonságai miatt, hogy időben történjen meg a palackok tisztítása, ezzel megakadályozva azt, hogy erős, stabil biofilm réteget alakítsanak ki. Törekedni kell a rendszeres mosógátószeres, tisztító kefével történő palack tisztításra, mivel az eredményeket figyelembe véve a súrolásos módszer a legalkalmasabb a biofilm eltávolítására, azonban nem minden mikroba által képzett biofilm eltávolítására megfelelő. Amennyiben lehetőség van rá minden újra töltés előtt ajánlott egy gyors öblítés alkalmazása, ezzel is hozzájárulva ahhoz, hogy akár az összerázás révén az újonnan megtapadt sejtek leváljanak. Hetente pedig javasolt lehet vegyszeres tisztítás, például ecetes forró vízzel, ami után alaposan öblítsük ki a palackot. További kísérleteket lehetne végezni tisztítási módszerekkel, hogy szélesebb képet kapjunk arról, hogy milyen mértékben lehet eltávolítani a kialakult biofilmeket. Esetleg más típusú tisztítási módszert is lehetne kiegészítésként alkalmazni. Ajánlott lehet mosógátógépbe is betenni, amennyiben a palackon feltűntetésre kerül, hogy alkalmas a mosógátógépben való tisztítása.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A diplomadolgozatom egy fontos, de annál kevésbé a köztudatban jelenlévő témával foglalkoztam, vagyis a rendszeresen használt ivópalackokon kialakult biofilmekkel. Nemcsak az ipari- vagy ivóvízrendszerek környezetében (csövek, tároló tartályok), beültetett orvosi eszközökben és természetes vízi rendszerekben alakulhat ki biofilm, hanem a mindennapokban használatos használati cikkekénél is, mint az újra használható rozsdamentes acél palack vagy a mindennapokban legtöbbször használt PET palackokban, amennyiben azt többször is használják. A legtöbb fogyasztó valószínűleg tudja, hogy a nem tisztított palackokban a mikroorganizmusok elszaporodhatnak. Azt azonban nem biztos, hogy tudják, hogy biofilmet képezhetnek, ami például előidézhethet egy legyengült immunrendszerrel rendelkező személynél fertőzést vagy rosszullétet.

Az elvégzett kísérletek által képet szerettem volna arról kapni, hogy milyen mikrobákat lehet a palackok szájáról azonosítani, amelyek képesek biofilmet képezni különböző felületeken. Szakirodalmi kutatás után az azonosított mikrobák közül néhányat először rozsdamentes acél - és műanyag modell felületen vizsgáltam, hogy megállapítsam képesek-e és ha igen milyen mértékben biofilmet képezni. Az első kísérleti rész után következhetett a rozsdamentes acél palackokban való biofilmképződésnek nyomonkövetése, majd a kapott eredmények összehasonlítása egy korábbi PET és PP palackokkal végzett vizsgálattal, hogy megtudjam a különböző anyagok befolyásolják-e a biofilmképződést. Végezetül tisztítási kísérlet arra vonatkozóan, hogy egyes tisztítási technikák mennyire hatékonyak a biofilm eltávolításában.

A palackok szájáról 31 mikrobát izoláltam, amelyből 25-öt sikerült azonosítani. Szakirodalmi kutatás után a következő négy mikrobát választottam ki további vizsgálatok céljára: *K. oxytoca*, *P. putida*, *S. epidermidis*, *S. maltophilia*.

A modell kísérletek eredményeit tekintve kijelenthető, hogy mindegyik mikroba képes volt biofilmet képezni a műanyagon -és rozsdamentes acél felületen egyaránt. A felületek között abban volt különbség, hogy milyen mértékben volt képes biofilmet képezni az adott felületen a mikroba. A műanyag felületen a *S. maltophilia* és *S. epidermidis*-nél volt megfigyelhető, hogy a sejtkoncentráció nagyobb volt a rozsdamentes acél felülethez képest. *P. putida* esetében a rozsdamentes acél felület volt kedvezőbb a biofilm kialakulásának, a *K. oxytoca* esetében pedig azonos mértékű biofilm képződött mind a két felületen. A kísérlet utolsó napján mért sejtkoncentráció értékek (10^3 - 10^6 TKE/cm²) potenciális fertőzési kockázatot jelenthetnek, amennyiben a humán szervezet legyengült. Az eredményeket összehasonlítva nem jelenthető

ki teljes bizonyossággal, hogy a rozsdamentes acél alkalmasabb és biztonságosabb a biofilm kialakulás megelőzését tekintve.

A rozsdamentes acél palackok vizsgálata során árnyaltabb képet kaptam. A *P. aeruginosa* esetében mértem a legnagyobb sejtkoncentrációt a 6 nap alatt. A *P. putida* és *A. delafieldii* sejtkoncentrációja a 0. napon a kimutatási határ alatt volt. Az *A. delafieldii* nem volt képes jelentős biofilmet képezni a palack felületén. A *P. putida* és *S. maltophilia* esetében hat nap alatt stabil biofilm alakult ki. A *S. epidermidis* sejtkoncentrációja a kezdeti növekedés ellenére a 6. napra a kimutatási határ alá csökkent, ami a modell kísérletnél nem volt tapasztalható, Ez annak tulajdonítható, hogy más volt a két kísérlet tápközege, és a vizet, mint tápanyagszegény környezetet nem tudta megfelelően hasznosítani

A PET és PP palackok eredményeivel összehasonlítva előnyösebb a rozsdamentes palackok használata, de további vizsgálatok szükségesek ennek bizonyításához.

Az tisztítási kísérlet során két módszert használtam, amely a háztartásokban rutinszerűen alkalmaznak. Az öblítéses (mosogatószeres steril víz) és a súrolós módszer (súrolókefe + mosogatószeres steril víz) szerettem volna összehasonlítani egymással és a kontroll mérésével, hogy milyen mértékben és mennyire hatékonyak ezek a tisztítási eljárások. Mind a kettő vizsgált mikrobánál elmondható, hogy mind a kettő módszer a kontroll értékhez képest csökkentette a sejtkoncentrációt, azonban a súrolós módszer bizonyult a leghatékonyabbnak. Fontos még megemlíteni, hogy a mikrobák megtapadása között különbség volt megfigyelhető, emiatt törekedni kell arra, hogy időben és megfelelően történjen meg a palackok tisztítása.

Továbbiakban érdekes lehet további vizsgálatokat végezni például egy több mikrobából álló biofilm képződéséről, mivel az emberi szájról alaphoz a palack szájára és belsejébe a nyállal többféle mikroorganizmus jut rá/be egyszerre. Ebből lehetne azt is vizsgálni, hogy milyen sejtkoncentrációban képes biofilmet képezni, valamint mely nemzetség/faj lehet a domináns a biofilm képződés során. Ezen kívül különböző anyagokon is ellehetne végezni és összehasonlítani a kapott eredményeket. Végül pedig itt is lehetne tisztítási kísérletet alkalmazni.

Az elvégzett kísérletek és az arra kapott eredményeim alapján elmondható, hogy szükség lenne a fogyasztók tájékoztatása arról, hogy a többször újra használt palackok esetén mennyire szükséges az, hogy rendszeresen és alaposan tisztítva legyenek. Olyan kezdeményezés is indulhatna ennek érdekében, hogy időben már a kisiskolás korban a gyerekeket neveljék és ösztönözzék arra, hogy palackjaikat / kulacsaikat rendszeresen tisztítsák.

7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

Abood, S.H., Ibrahim, I. A. J. (2017). Comparison of biofilm formation by different species of *Klebsiella*. Pak. J. Biotechnol. Vol. 14 (4) (Pages 531-535)

Aboyadak, I.M., Abdel-Tawwab, M., Ali, N.G. (2024). Identification and florfenicol-treatment of *pseudomonas putida* infection in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed on tilapia-trashfeed. BMC Veterinary Research (2024) 20:156 (Pages 1-11)

DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04004-z>

Adegoke, A.A., Stenström, T.A., okoh, A. (2017). *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy Volume 8 (Pages 1-18)

DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02276>

Amadi, A., Chen, D., Tong, E. (2020). Analyzing knowledge, attitudes and practices around reusable water bottles (Pages 2)

DOI: <https://doi.org/10.47339/ephj.2020.16>

Arlian, L. G. (1992). Water balance and humidity requirements of house dust mites. Experimental & Applied Acarology, 16 (1992) (Pages 15-35)

DOI: [10.1007/BF01201490](https://doi.org/10.1007/BF01201490)

Arweiler, N.B., Netuschil, L. (2016). The Oral Microbiota. Medicine and Biology 902. (Pages 45-60)

DOI: [10.1007/978-3-319-31248-4_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4)

Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C. (2016). Critical review on biofilm methods., Critical Reviews in Microbiology. (Pages 1-10)

DOI: [10.1080/1040841X.2016.1208146](https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146)

Ball, P. (2008). Water as an Active Constituent in Cell Biology. Chem. Rev. 108 (Pages 74)

DOI: <https://doi.org/10.1021/cr068037a>

Benavides, P. T., Dunn, J. B., Han, J., Biddy, M., Markham, J. (2018). Exploring Comparative Energy and Environmental Benefits of Virgin, Recycled, and Bio-Derived PET Bottles. ACS Sustainable Chem. Eng. 2018, 6, 8, (Pages 9725–9733)

DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00750>

Bratić, V., Mkihaljević, S., Verzak, Ž., Pleško, E., Lukić, A., Čačić, M. (2021). Prophylactic application of antibiotics selects extended-spectrum β -lactamase and carbapenemases producing Gram-negative bacteria in the oral cavity. *Lett Appl Microbiol* 2021 Aug;73(2):206-219 (Pages 206-219)

DOI: [10.1111/lam.13493](https://doi.org/10.1111/lam.13493)

Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L., Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology* Vol.13 No.1 (Pages 20-24)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>

Bridier, A., Piard, J.C., Briandet, R., Bouchez, T. (2019). Emergence of a Synergistic Diversity as a Response to Competition in *Pseudomonas putida* Biofilms. (Pages 5)

DOI: [10.1007/s00248-019-01470-z](https://doi.org/10.1007/s00248-019-01470-z)

Brooke, J.S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* Vol. 25, No. 1. (Pages 2-41)

DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-11>

Burcham, Z.M., Garneau, N.L., Comstock, S.S., Tucker, R.M., Knight, R., Metcalf, J.L., Genetics of Taste Lab Citizen Scientists. (2020). Patterns of Oral Microbiota Diversity in Adults and Children: A Crowdsourced Population Study. *Scientific Reports* 10:2133 (Pages 1-12)

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59016-0>

Bürgers, R., Witte, C., Hahnel, S., Gosau, M. (2012). The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Archives of Oral Biology*. Volume 57, Issue 7, July. (Pages 940-947)

Castellanos, J., González-Cuevas, A., Dr. Font-Vizcarra, L. (2014). Adherence of *S. Epidermidis* on Different Metals. A Comparative in Vitro Study. (Pages 1-11)

DOI: <https://doi.org/10.5301/jabfm.500>

Chan, X.Y., Chua, K.O., How, K.Y., Yin, W-F., Chan, K-G. (2014). Global Genome Comparative Analysis Reveals Insights of Resistome and Life-Style Adaptation of

Pseudomonas putida Strain T2-2 in Oral Cavity. The Scientific World Journal Volume 2014 (Pages 1-3)

DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/930727>

Chang, H., Dai, F., Duan, G., Zhao, S., Lu, H., Xiang, X. (2018). Pathogenicity Analysis of *Klebsiella oxytoca* Isolated from *Larus ridibundus* migratory birds. Pak Vet J, 38(4): (Pages 449-451)

DOI: <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2018.096>

Chudwick, E., Salvemini, M., Welker, A. (2013). Implementing water refill stations across campus to promote reusable water bottle use. (Pages 3-4)

Critchley, M.M., Cromar, N.J., McClure, N.C., Fallowfield, H.J. (2003). The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria. Journal of Applied Microbiology 2003, 94, (Pages 501–507)

DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01857.x>

Dancs, V. (2020). Műanyag palackokban képződött biofilmek és azok eltávolítási módszereinek összehasonlítása

da Rocha Santos, L.M.B., de Paula Ramos, L., Santos, C.E.R., Mirand, D.G., Gimenez, M.G., Meccatti, V.M., Abu Hasna, A., Dos Santos Oliveira, M., Netp, M.B., Dias de Oliveira, L. (2023). Saliva culture as a predictive indicator for current blood infections and antimicrobial resistance in the ICU setting. Sci Rep. 2023 Nov 20;13(1):20317. (Pages 1-8)

DOI: [10.1038/s41598-023-47143-3](https://doi.org/10.1038/s41598-023-47143-3)

de Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M.L.N.E., Maltez, L., Pereira, J.E., Capita, R., Alonso-Calleja, C. Igrejas, G., Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci., 22, 12892. (Pages 2-28).

DOI: [10.3390/ijms222312892](https://doi.org/10.3390/ijms222312892)

Denton, M., Kerr, K.G. (1998). Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical Microbiology Reviews Vol. 11, No. 1. (Pages 57-80)

DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.57>

Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W-H., Lakshmanan, A., Wade, W.G. (2010). The Human Oral Microbiome. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Oct. 2010, p. 5002–5017. (Pages 5002-5017).

DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00542-10>

DiNicolantonio, Hansen-Smith, E., Rice, S. (2022). Analysis of Water Use for Water Bottle Production. (Pages 6)

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases Vol. 8, No. 9 (Pages 881-888)

DOI:[10.3201/eid0809.020063](https://doi.org/10.3201/eid0809.020063)

Fernández, M., Porcel, M., de la Torre, J., Molina-Henares, M.A., Daddaoua, A., Llamas, M.A., Roca, A., Carriel, V., Garzón, I., Ramos, J.L., Alaminos, M., Duque, E. (2015). Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. ORIGINAL RESEARCH Article 871 Volume 6. (Pages 1-9)

DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00871>

Fey, P.D., Olson, M.E. (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. Future Microbiol. (2010) 5(6), (Pages 917–933)

DOI: [10.2217/fmb.10.56](https://doi.org/10.2217/fmb.10.56)

Flemming, H-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Ric, S.A., Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY VOLUME 14. (Pages 563-573)

DOI: [10.1038/nrmicro.2016.94](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94)

Flores-Treviño, S., Bocanegra-Ibarias, P., Camacho-Ortiz, A., Morfín-Otero, R., Salazar-Sesatty, H.A., Garza-González, E. (2019). *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm: its role in infectious diseases. (Pages 877-893)

DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1685875>

Fonseca, P., Moreno, R., Rojo, F. (2011). Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. Environmental Microbiology Reports (2011) 3(3), (Pages 329–339)

DOI: [doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00229.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00229.x)

Geerts, R., Vandermoere, F., Van Winkle, T., Halet, D., Joos, P., Van Den Steen, K., Van Meenen, E., Blust, R., Borregán-Ochando, E., Vlaeminck, S. E. (2020). Bottle or tap? Toward an integrated approach to water type consumption. *Water Research* 173 (2020) 115578 (Pages 1)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115578>

Goldberg, S., Cardash, H., Browning, H., Shaly, H., Rosenberg, M. (1997). Isolation of Enterobacteriaceae from the Mouth and Potential Association with Malodor. *J Dent Res* 76(11): 1770-1775, (Pages 1770-1775)

DOI: [10.1177/00220345970760110801](https://doi.org/10.1177/00220345970760110801)

Gomes, I.B., Simões, L.C., Simões, M (2020). Influence of surface copper content on *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm control using chlorine and mechanical stress. (Pages 1-14)

DOI: [10.1080/08927014.2019.1708334](https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1708334)

Hamade, R., Hadchiti, R., Ammouri, A. (2020). Making the Environmental Case for Reusable PET Bottles. *Procedia Manufacturing* 43 (2020) 201–207 (Pages 201)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2020.02.137>

Häubler, S. (2004). Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 6(6), (Pages 546–551)

DOI: [doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00618.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00618.x)

Iversen, B. G., Jacobsen, T., Eriksen, H-M., Bukholm, G., Melby, K. K., Nygaard, K., Aavitsland, P. (2007). An Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infection Caused by Contaminated Mouth Swabs. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 44, Issue 6, 15 March 2007, (Pages 794-800)

DOI: <https://doi.org/10.1086/511644>

Jenkinson, H.F., Lamont, R.J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *TRENDS in Microbiology* Vol.13 No. 12 December 2005 (Pages 589-594)

DOI: [10.1016/j.tim.2005.09.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.09.006)

Królasik, J., Żakowska, Z., Krępska, M., Klimek, L. (2010). Resistance of Bacterial Biofilms Formed on Stainless Steel Surface to Disinfecting agent. Polish Journal of Microbiology 2010, Vol. 59, No 4, (Pages 281–287)

DOI: <https://doi.org/10.33073/pjm-2010-042>

Krzyściak, W., Jurczak, A., Piątkowski, J. (2016). The Role of Human Oral Microbiome in Dental Biofilm Formation (Pages 329-330)

DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/63492>

Lee, C., Jang, Y.-C., Choi, K., Kim, B., Song, H., Kwon, Y., (2024). Recycling, Material Flow, and Recycled Content Demands of Polyethylene Terephthalate (PET) Bottles towards a Circular Economy in Korea. Environments 2024, 11, 25. (Pages 1-14)

DOI: <https://doi.org/10.3390/environments11020025>

Liu, H., Liu, Q. (2017). Rapid Microbial Growth in Reusable Drinking Water Bottles. Ann Civil Environ Eng. 2017; 1: 055-062. (Pages 1-8)

DOI: [10.29328/journal.acee.1001007](https://doi.org/10.29328/journal.acee.1001007)

MacLeod, D.T., Cogen, A.L., Gallo, R.L. (2009). Skin Microbiology. Encyclopedia of Microbiology. (Pages 734-747).

DOI: [10.1016/B978-012373944-5.00205-4](https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00205-4)

Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. International Biodeterioration & Biodegradation 51 (2003) (Pages 249 – 253)

DOI: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00047-7)

Mosaddad, S.A., Tahmasebi, E., Yazdanian, A., Rezvani, M. B., Seifalian, A., Yazdanian, M., Tebyanian, H. (2019). Oral microbial biofilms: an update. (Pages 1-15)

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03641-9>

Müsken, M., Di Fiore, S., Dötsch, A., Fischer, R., Häussler, S. (2010). Genetic determinants of Pseudomonas aeruginosa biofilm establishment. Microbiology, 156, (Pages 431–441)

DOI: [10.1099/mic.0.033290-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.033290-0)

Obiofu, E.N., Ige, O.H., Chikezie, E.N. (2018). Microbiological assessment of biofilm formation on different water storage containers. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2018, 05(03), (Pages 115–123)

DOI: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2018.5.3.0150>

Onyango, L.A., Dunstan, R.h., Gottfries, J., von Eiff, C., Roberts, T.K. (2012). Effect of Low Temperature on Growth and UltraStructure of Staphylococcus spp PLoS ONE 7(1): e29031. (Pages 1-10)

DOI: [10.1371/journal.pone.0029031](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029031)

Orset, C., Barret, N., Lemaire, A. (2017). How consumers of plastic water bottles are responding to environmental policies?. Waste Management 61 (2017) (Pages 13-27)

DOI: [10.1016/j.wasman.2016.12.034](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.034)

Osatogbe, A.J., Attah, D.D., Manga, S.S., Aliero, A.A., Farouq, A.A. (2023). The Studies on the Bacteria in the Oral Cavities of In-Patient Malnourished Children at Specialist Hospital, Sokoto, Nigeria, Africa. Research - International Journal of Medical Research & Health Sciences. Volume 12, Issue 10 (Pages 1-21)

DOI: [10.56201/ijmepr.v7.no4.2023.pg1.21](https://doi.org/10.56201/ijmepr.v7.no4.2023.pg1.21)

Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis —the ‘accidental’ pathogen. NATure revIewS | Microbiology volume 7 | AUGUST 2009 (Pages 555-567)

DOI: [10.1038/nrmicro2182](https://doi.org/10.1038/nrmicro2182)

Proctor, D.M., Relman D.A. (2017). The Landscape Ecology and Microbiota of the Human Nose, ath, and Throat. Cell Host & Microbe 21, April 12. (Pages 421-430)

DOI: [10.1016/j.chom.2017.03.011](https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.011)

Radó, J. (2011). Az ember vízházartartása. Magyar Tudomány 172. évf. 12. sz. (Pages 1440)

Salam, M.A., Senpuku, H., Nomura, Y., Matin, K., Miyazaki, H., Hanada, N. (2001). Isolation of Opportunistic Pathogens in Dental Plaque, Salvia and Tonsil Samples from Elderly. (Pages 193-195)

Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S.V., Kapila, Y.L. (2000). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. Periodontology 2000. 2021;87:107–131. (Pages 107-110)

DOI: [10.1111/prd.12393](https://doi.org/10.1111/prd.12393)

Sharma, G., Raou, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., Gabran, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. Biologicals Volume 42, Issue 1, January (Pages 1-7)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.001>

Siddiqui, S. A., Profeta, A., Decker, T., Smetana, S., Menrad, K. (2023). Influencing Factors for Consumers' Intention to Reduce Plastic Packaging in Different Groups of Fast-Moving Consumer Goods in Germany. *Sustainability* 2023, 15, 7625. (Pages 1-21)

DOI: <https://doi.org/10.3390/su15097625>

Simon, B., Amor, M.B., Földényi, R. (2016). Life cycle impact assessment of beverage packaging systems: focus on the collection of post-consumer bottles. *Journal of Cleaner Production* 112 (Pages 238-248)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.06.008>

Singhal, L., Kaur, P., Gautam, V. (2018). *Stenotrophomonas maltophilia*: From Trivial to Grievous. *Indian J Med Microbiol* 2017;35:469-79 (Pages 471)

DOI: [10.4103/ijmm.IJMM_16_430](https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_430)

Smith, A.J., Jackson, M.S., Bagg, J. (2001). The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *Med. Microbiol.* — Vol. 50 (2001), (Pages 940–946)

DOI: [10.1099/0022-1317-50-11-940](https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-11-940)

Sun, X., Kim, J., Behnke, C., Almanza, B., Greene, C., Miller, J., Schindler, B. (2017). The Cleanliness of Reusable Water Bottles: How Contamination Levels are Affected by Bottle Usage and Cleaning Behaviors of Bottle Owners. *Food Protection Trends*, Vol 37, No. 6, (Pages 392–402)

Sutter, V.L., Hurst, V., Landucci, A.O.J. (1966). *Pseudomonads* in Human Saliva. (Pages 1800-1803)

DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034566045006360org/10.1177/0022034566045006360>

Tabaco, A., Heacock, H., Shaw, F. (2018). Bacterial Growth in Personal Stainless Steel Water Bottles: How Often Should You Clean Your Bottle? (Pages 1-14)

DOI: [10.47339/ephj.2018.55](https://doi.org/10.47339/ephj.2018.55)

Tang, B., Gong, T., Cui, y., Wang, L., He, C., Lu, M., Chen, J., Jing, M., Zhang, A., Li, Y. (2020). Characteristics of oral methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from dental plaque. *International Journal of Oral Science* (2020) 12:15 (Pages 1-10)

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0079-5>

Todar, W., (2004). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. (Pages 1-580).

Wade, W.G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research* 69 (Pages 137–143)

DOI: [10.1016/j.phrs.2012.11.006](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006)

Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D.C., Nickel, P.I., Wittmann, C. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2020) 104:7745–7766. (Pages 1-2)

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9>

Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J., (2015). *Acidovorax*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Online. (Pages 1-16).

DOI: [10.1002/9781118960608.gbm00943](https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00943)

Yang, J., Long, H., Hu, Y., Feng, Y., McNaally, A., Zong, Z. (2022). *Klebsiella oxytoca* Complex: Update on Taxonomy, Antimicrobial Resistance, and Virulence. *Clin Microbiol Rev* 35:e00006-21. (Pages 1-39)

DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-21>.

Yoshino, Y., Kitazawa, T., Kamimura, M., Tatsuno, K., Ota, Y., Yotsuyanagi, H. (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J Infect Chemother* (2011) 17:278–282 (Pages 278-282)

DOI: [10.1007/s10156-010-0114-0](https://doi.org/10.1007/s10156-010-0114-0)

Yu, J., Kim, D., Lee, T. (2010). Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Sci Technol* (2010) 61 (1): (Pages 163–171).

DOI: <https://doi.org/10.2166/wst.2010.813>

Zacheus, O.M., Iivanainen, E.K., Nissinen, T.K., Lehtola, M.J., Martikainen, P.J. (2000). Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Wat. Res. Vol. 34, No. 1.* (Pages 63-70).

DOI: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00113-X)

Zhou, X. (2015). *Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease* (Pages 41-65)

DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00003-3>

Internetes hivatkozások:

Internet 1. [Microbiologyinpictures.com](https://www.microbiologyinpictures.com) (Elérés 2024.10.19.)

<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/pseudomonas-aeruginosa-photos/pseudomonas-aeruginosa-tsa.html>

Jogszabályok:

5/2023. (I. 12.) Korm.- rendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről

8. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

8.1. Ábrák

1. ábra: A PET palackok várható fogyasztási igénye forgatókönyvenként 2040-ig.	4
2. ábra: A különböző anyagú palackok előállításához felhasznált víznek az időbeli megtérülése	5
3. ábra: A palack tisztítási gyakoriságának és a palack belső felületének szennyezettsége közötti összefüggés	8
4. ábra: Palack tisztítás módszerének hatása a palack belső felületén mérhető mikrobakoncentrációra.	8
5. ábra: Elektronmikroszkópos kép egy ipari vízvezetékben kialakult biofilmről	11
6. ábra: A különböző csőanyagokon kialakuló biofilmek ATP-koncentrációja 90 napos inkubáció után ivóvízben (a) és kevert vízben (b) (CU- réz, SS- rozsdamentes acél, ST- cinkkel bevont acél, CP- klórozott műanyag, PB- polibutilén, PE- polietilén)	13
7. ábra: A) Staphylococcus epidermidis sejtek (Gram-festés). (B) S. epidermidis sejtek (SEM). A S. epidermidis sejtek gömb alakúak (0,5-1,5 µm átmérőjűek) és Gram-pozitívok. A kókuszkok tetradákba és klaszterekbe szerveződnek. Esetenként egyes sejtek is megfigyelhetők. (C) S. epidermidis kolóniák agarlemezen inkubálva. (D) S. epidermidis kolóniák (sztereomikroszkóp)	18
8. ábra: A K. oxytoca tenyésztési jellemzői különböző körülmények között. B) Tápanyagleves agarlemezek; C) juhvér agar táptalaj; D) MacConkey táptalaj; E) SS agar táptalaj; F) LB agar.	20
9. ábra: A Stenotrophomonas maltophilia kolóniái a) vér-agar lemezen, (b) MacConkey agar lemezen, (c) Mueller-Hinton agar lemezen	21
10. ábra: Kémiai és/vagy mechanikai kezelés hatása különböző réztartalmú felületeken kialakult biofilmekre	22
11. ábra: A P. putida változatok fenotípusos jellemzése. (A) Telepek morfológiája TSA Petri csészéken. (B) Sejtmorfológia. (C) Makrokolóniák szerkezete agarlemezekben. (D) Úszási és (E) rajképeség. (F) Pelliculumok képződése táptalajcsövekben.....	23
12. ábra: SEM mikrofotók baktériumok által kialakított biofilmről rozsdamentes acél felületen: A - Micrococcus luteus, B - Pseudomonas putida, C- Staphylococcus hominis, D - Listeria innocua	24

13. ábra: Fertőtlenítőszer hatása a <i>Micrococcus luteus</i> (A), <i>Pseudomonas putida</i> (B), <i>Staphylococcus hominis</i> (C) és <i>Listeria innocua</i> (D) által képzett biofilmre a koncentráció és a kontaktidő függvényében.	24
14. ábra: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TSA agaron	25
15. ábra: <i>S. epidermidis</i> élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél és PP modell lemez felületén	34
16. ábra: <i>K. oxytoca</i> élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél és PP modell lemez felületén	35
17. ábra: <i>S. maltophilia</i> élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél és PP modell lemez felületén	36
18. ábra: <i>P. putida</i> élősejtszámának alakulása rozsdamentes modell lemez felületén	36
19. ábra: Vizsgált baktériumok élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél palackban tárolt vízben	38
20. ábra: Vizsgált baktériumok élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél palack belső felületén	39
21. ábra: <i>P. putida</i> és <i>P. aeruginosa</i> élősejtszámának alakulása rozsdamentes acél palack belső felületén - tisztítási kísérlet	40

8.2. Táblázatok

1. táblázat: A palack anyagának hatása a palack külső szennyezettségére biolumineszcencián alapuló ATP kimutatás módszerével mérve.....	9
2. táblázat: Összes mikrobaszám alakulása különböző folyadékok esetén a palackokban (víz, egyéb: kávé, tea, energiatital) Az elmúlt 7 napban a palackokban fogyasztott italoknak a hatása.	9
3. táblázat: Mikroorganizmusok izolálási gyakorisága fogkőben, nyálban és mandulában ...	17

9. MELLÉKLETEK

M1 táblázat: 31 ismeretlen minta MALDI-TOF MS-sel való azonosításának eredményei

Minta ID	Organizmus (legjobb egyezés)	Pontszám értéke	Organizmus (második legjobb egyezés)	Pontszám értéke
1/1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2,47	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2,46
3/1	Ismeretlen	1,24	Ismeretlen	1,22
3/2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,19	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,07
3/3	<i>Microbacterium maritipicum</i>	2,28	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	2,25
3/4	Ismeretlen	1,55	Ismeretlen	1,46
3/5	<i>Candida albicans</i>	1,88	<i>Candida albicans</i>	1,87
3/6	Ismeretlen	1,45	Ismeretlen	1,43
4/1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2,13	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,92
4/2	<i>Microbacterium maritipicum</i>	2,35	<i>Microbacterium maritipicum</i>	2,21
5/1	<i>Pseudomonas oryziabactans</i>	1,71	Ismeretlen	1,57
5/2	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	2,01	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	1,98
5/3	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2,29	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2,27
6/1	Ismeretlen	0,00	Ismeretlen	0,00
6/2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,08	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,06
6/3	<i>Streptococcus mitis</i>	2,02	<i>Streptococcus mitis</i>	2,00
7/1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2,36	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,35
7/2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,29	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,28
7/3	<i>Brevundimonas diminuta</i>	2,09	<i>Brevundimonas diminuta</i>	2,07
8/1	<i>Sphingobacterium daejeonense</i>	2,12	Ismeretlen	1,69
8/2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,03	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,94
8/3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,05	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,91
10/1	<i>Delftia acidovorans</i>	2,06	<i>Delftia acidovorans</i>	2,06
10/2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	2,08	<i>Brevundimonas diminuta</i>	2,05
10/3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,06
11/1	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,47	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,38
11/2	<i>Acinetobacter ursingii</i>	2,20	<i>Acinetobacter ursingii</i>	2,14
11/3	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,41	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2,38
12/1	<i>Microbacterium hatanonis</i>	1,78	Ismeretlen	1,64
12/2	<i>Pantoea agglomerans</i>	1,93	<i>Pantoea agglomerans</i>	1,73
12/3	<i>Pseudomonas putida</i>	2,17	<i>Pseudomonas putida</i>	2,03
12/4	<i>Candida albicans</i>	1,94	<i>Candida albicans</i>	1,88

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Schreiner Lilla
A Hallgató Neptun kódja: C2IZL3
A dolgozat címe: Szájüreg eredetű baktériumok biofilm képzése modell felületeken és fém ivópalackban
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
A konzulens tanszékének a neve: Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat 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.

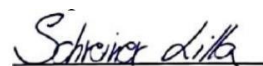
Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

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

Kelt: 2024 év november hó 4 nap



Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Schreiner Lilla (C2IZL3) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre **javaslom** / **nem javaslom**¹.

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

Kelt: Budapest, 2024. november 3.


belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.