

SZAKDOLGOZAT

HADHÁZI VIVIEN JENNI SZAKDOLGOZAT

Hadházi Vivien Jenni

2023.05.03



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Élelmiszertudományi és
Technológiai Intézet

Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Tejsavbaktérium törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata

Hadházi Vivien Jenni

Budapest

2023.05.03.

HADHÁZI VIVIEN JENNI SZAKDOLGOZAT

*Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet*

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológiai

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Hallgató: Hadházi Vivien Jenni

A szakedolgozat címe: **Tejsavbaktérium törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata**

Konzulensek: Dr. Kosztik Judit, Batáné Dr. Vidács Ildikó

Beadás dátuma: 2023. 05.03.


szakedolgozat készítés helyének vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang


konzulens
Dr. Kosztik Judit


Dr. Nguyen Duc Quang
modul szerinti tanszék vezetője

Tartalom

1. Bevezetés.....	1
1. Célkitűzések	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
3.1. Tejsavbaktériumok.....	4
3.1.1. Tejsavbaktériumok felhasználása.....	7
3.2. Probiotikumok.....	8
3.2.1. Probiotikumok állati takarmányokban	11
3.3. Antibiotikumok	12
3.3.1. Ampicillin.....	13
3.3.2. Eritromicin	13
3.3.3. Kanamicin	13
3.3.4. Klóramfenikol	13
3.3.5. Sztreptomicin	14
3.4. Antibiotikum rezisztencia	14
4. Anyagok és módszerek.....	17
4.1. Felhasznált mikroorganizmusok	17
4.2. Felhasznált tápközegek	17
4.2.1. MRS tápleves	17
4.2.2. MRS tápagar.....	17
4.3. Felhasznált antibiotikumok	17
4.4. Alkalmazott módszerek.....	19
4.4.1. Fagyasztott baktériumok felélesztése.....	19
4.4.2. Sejtszám meghatározás	19
4.4.3. Antibiotikum érzékenység vizsgálata.....	19
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	21
5.1. Bürker-kamrás számolás eredményei.....	21
5.2. Korong diffúziós vizsgálat eredményei.....	22
5.3. Abszorbancia mérés eredményei.....	23
6. Összefoglalás.....	36
7. Irodalmi hivatkozás	1
Köszönetnyilvánítás	7

1. Bevezetés

A megfelelő étrend és táplálkozás az egészséges életmód egyik fontos alappillére, ebből kifolyólag a vásárlók folyamatosan növekvő egészségtudata végett az egészséget támogató élelmiszerek iránti kereslet megnőtt. A tejsavbaktériumok jelentős szerepet játszanak az egészséges táplálkozásban, hozzájárulnak az egészség megőrzéséhez, természetes módot biztosítanak az élelmiszerek tartósítására. Azokat az élelmiszereket, amelyek olyan összetevőket tartalmaznak, amelyek amellet, hogy táplálók, még pozitívan támogatják, elősegítik a test bizonyos funkcióinak működését is, funkcionális élelmiszereknek nevezzük (Kaur és Das, 2011). A funkcionális élelmiszerek fontos szerepet töltenek be az egészséges életmódban, számos pozitív tulajdonságukkal járulnak hozzá a szervezet megfelelő működéséhez, elfogyasztásukkal bizonyos betegségek súlyosbodása csökkenthető, népbetegségek kialakulása megelőzhető.

A megfelelő táplálkozás elősegíti a szervezet optimális működését, segíti a patogének elleni megfelelő védelem kialakulását, megelőzhetőek bizonyos betegségek kialakulásai, a várható élettartam növelhető. A ma élő emberek életminősége szignifikánsan magasabb, mint az előző generációké, ez köszönhető a tudománynak, az orvoslás és a technológiák fejlődésének, illetve a minőségi táplálkozásnak is egyaránt. Ezek tudatában az élelmiszerek nem kizárólag az éhség csillapítását szolgálják, hanem a táplálkozással összefüggésben álló népbetegségek megelőzésére is alkalmazhatóak, továbbá a testi és lelki jólét javítását is szolgálják (Menrad, 2003).

Az emlősök gasztrointesztinális traktusa számos mikroorganizmusnak ad otthont, melyeket összefoglalóan bélmikrobiótának nevezünk. Ezen baktériumok befolyásolják a gazdaszervezet fiziológiáját, a bélben zajló metabolizmus hatékonyságát és az immunműködést (Rowland, 1988). A vastagbél a fő kolonizáció helye, az itt fellelhető mikrobiótát több mint 500 különböző baktériumfaj alkotja (Blaut et al., 2002). Azokat az élő mikroorganizmusokat, amelyek megfelelő mennyiségben adagolva pozitív hatással vannak a gazdaszervezet egészségére, probiotikumoknak nevezzük (AT és Action, 1999; Gueimonde et al., 2013). A tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok nemzetségébe tartozó baktérium törzsek közül a leginkább tanulmányozott és legszélesebb körben alkalmazott törzsek probiotikus tulajdonságokkal bírnak, és ezek jelentős múlttal rendelkeznek az

élelmiszeriparban történő felhasználásban. Számos vásárló aggódik a feldolgozott élelmiszerek fogyasztása miatt, továbbá az élelmiszerekben található kémiai tartósítószer okozta káros hatások miatt. A tejsavbaktériumokat tartalmazó, illetve azok felhasználásával készült élelmiszerek hosszabb ideig megőrzik minőségüket bizonyos tejsavbaktérium törzsek által riboszomálisan szintetizált baktericinok miatt, amelyek olyan fehérjék, melyek gátolják a romlást okozó patogén baktériumok növekedését az élelmiszerekben, ezáltal az élelmiszertartósítás természetes módját jelentik meg (Hoover és Steenson, 2014). A tejsavbaktériumok által termelt tejsav továbbá csökkenti az élelmiszer pH értékét, amely szintén gátolja a baktériumok szaporodását.

A bélbaktériumok fontos szerepet játszanak a bélrendszer egészséges állapotának megőrzésében, a rák megelőzésében, az elhízás és a hipertónia, cukorbetegség, illetve a koleszterinszint csökkentésében (Papp-Bata és Szakály, 2021). A jótékony egészségügyi tulajdonságok törzsspecifikusak, különböző mechanizmusok befolyásolják őket. A megfelelő étkezés hozzájárul az egészséges öregedés folyamatához is, az egészség megőrzésre történő törekvések egyre elterjedtebbek napjainkban. A megnőtt kereslet kielégítése érdekében nőtt az igény az újabb probiotikus tulajdonságú baktériumok meghatározására és ezek felhasználására élelmiszerekben, mely folyamatnak fontos kitétele, hogy az adott baktériumtörzs nem lehet patogén tulajdonságú mikroorganizmus, továbbá nem lehet rezisztenciája az adott törzsnek bizonyos meghatározott antibiotikumokra.

1. Célkitűzések

Tejsavbaktérium törzsek antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata, annak érdekében, hogy az esetleges probiotikus tulajdonságokkal rendelkező tejsavbaktérium törzseket a későbbiekben akár takarmánykiegészítő adalékanyagként lehessen alkalmazni. Ezért célul tűztem ki az alábbi vizsgálatok elvégzését:

- A vizsgált törzsek sejtszámának meghatározása Bürker-kamrás számolással az egységes sejtkoncentráció biztosításához a vizsgálatokban.
- Tejsavbaktérium törzsek antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata az EFSA (European Food Safety Authority) által meghatározott antibiotikum határérték koncentráció alkalmazásával korong diffúziós módszer, valamint abszorbancia mérés elvégzésével.

2. Irodalmi áttekintés

3.1. Tejsavbaktériumok

A 20. század fordulója előtti időszakban a tejsavbaktériumok kifejezést a tejet savanyító baktériumokra alkalmazták. A tejsavbaktériumok, mint mikroorganizmus csoport fogalma az 1900-as évek elején alakult ki, melyet úttörő tudományos és technikai/műszaki fejlődés előzött meg. A tejsavbaktériumok élelmiszerekkel történő kölcsönhatásaira már korán felfigyeltek a tudósok, ehhez Pasteur munkássága jelentősen hozzájárult a tejsavas erjedés tanulmányozásával 1857-ben (Stiles és Holzapfel, 1997). Az első tiszta baktériumtenyészet a *Bacterium lactis* volt, melyet 1873-ban J. Lister izolált és feltehetőleg a ma ismert *Lactococcus lactis* lehetett (Salminen és Von Wright, 2004). Orla-Jensen 1919-ben megjelent publikációjában bizonyos tulajdonságok alapján osztályozta a tejsavat termelő mikroorganizmusokat. A morfológiájukat tekintve különböző csoportba sorolta őket: kokkus, pálcá, tetrád formáció (Petros I Rafailidis et al., 2007), illetve annak függvényében, hogy a glükózt hogyan fermentálták és mennyi végtermék keletkezett (homo- vagy heterofermentáló), továbbá a képződő tejsav síkban polarizált fény forgatásának módja szerint (L,D vagy mindkettő), a növekedésükre jellemző hőmérséklet alapján (10 °C vagy például 45 °C), illetve az alapján, hogy milyen metabolizációs útvonalon hasznosítják a rendelkezésre álló cukrot (Carr et al., 2002; Okano et al., 2009). Taxonómiaiilag a tejsavbaktériumok a *Firmicutes* törzshez, *Bacillus* osztályba, *Lactobacillák* rendjébe tartoznak, melyek magukba foglalják a *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus* és *Weissella* nemzetségeket (De Angelis et al., 2007; Reddy et al., 2008), amelyekre mind jellemző, hogy alacsony guanin-citozin tartalmú organizmusok. Egyes források az *Actinobacteria* törzsből származó *Atopobium* és *Bifidobacterium* nemzetségeket is a tejsavbaktériumokhoz sorolják, mivel hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, azonban magasabb guanin-citozin arányt mutatnak (Wedajo, 2015). A *Bifidobacterium* fajok megfelelnek ugyan a tejsavbaktérium általános leírásának, azonban filogenetikailag nagyobb rokonságban állnak a Gram-pozitív baktériumok *Actinomycetaceae* csoportjával. Továbbá, a bifidobaktériumok nemzetségre jellemző, speciális cukor-fermentációs úttal rendelkeznek, mely szintén elválasztja őket a tejsavbaktériumok csoportjától (Salminen és Von Wright, 2004).

A tejsavbaktériumokról filogenetikailag általánosan elmondható, hogy Gram-pozitív, spórátlan, mikroaerofil kokkusok és pálcák, melyek a szénhidrátok fermentációjának fő végtermékeként tejsavat állítanak elő. Kataláz-, oxidáz-, benzidin-negatív mikroorganizmusok, melyek jól tűrik az alacsony pH-t, nem tartalmaznak citokrómokat, nem redukálják a nitrátokat nitritté. Aerotoleráns, mikroaerofil vagy fakultatív anaerob mikroorganizmusok, amelyeknek a növekedésükhöz szükséges hőmérsékleti optimum 30 °C és 40 °C közötti hőmérséklet az ideális, azonban egyes törzsek képesek 5 °C-nál alacsonyabb és 45 °C-nál magasabb hőmérsékleten is növekedni (Görner és Valik, 2004). A tejsavbaktériumok szénhidrátban gazdag élőhelyeken fordulnak elő általában, mint például növényekben, fermentált élelmiszerekben, megtalálhatóak szárazföldi, illetve tengeri élőlények nyálkahártyáján, emlősök szájának, bélrendszerének, illetve a hüvely normál flórájának is tagjai meglehetősen diverz közösséget alkotva. (Aureli et al., 2011; Barinov et al., 2011)

A tejsavbaktériumok a glükóz fermentációja során különböző tejsav izomereket képeznek. A tejsav kriális molekula, tehát a lineárisan polarizált fény síkját elforgatja. A tejsav kivonható a fermentált termékből és a fény optikai forgatásának képessége szerint három enantiomer formára bontható: a polarizált fényt az óramutató járásával ellenkező irányban forgatja, tehát balra, ezt nevezik L(+)-tejsavnak. Amennyiben az optikai fényt az óramutató járásával megegyező irányba, tehát jobbra forgatja, abban az esetben D(-)-tejsavnak nevezzük, előfordulhat racemens vegyület, mely LD(+-) mindkét enantiomert tartalmazza. (Carr et al., 2002)

A tejsavas erjedés módja szerint a mikrobákat homofermentatív és heterofermentatív csoportokba sorolhatjuk. A két kategória közötti eltérés a hasítási enzimek jelenlétében vagy hiányában nyilvánul meg az Embden-Meyerhof útvonal (fruktóz 1,6-difoszfát elhasítása történik aldoláz enzim segítségével, melyből ennek hatására két trióz-foszfát izomeráz képződik, amelyek tovább alakulnak laktáttá) és a foszfoketoláz útvonal esetén. A homofermentatív erjesztők tejsavat termelnek a glükózfermentáció során, standard fermentációs körülmények között a piruvát csak kis százalékából állítanak elő mellékterméket, aldoláz enzim segítségével képesek a glükózt közvetlenül tejsavvá fermentálni, így a folyamat végtermékeként szinte kizárólag tejsav keletkezik. Ebbe a csoportba tartozik néhány *Lactobacillus* és a legtöbb *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* és *Vagococcus* faj. A heterofermentatív fermentáció első lépésében egy oxidációs folyamat megy végbe, mely során a glükóz-6-

foszfát glükonát-6-foszfáttá oxidálódik, majd ezt követően dekarboxileződési folyamat végeredményeként pentóz-5-foszfát C-2 és C-3 részekre hasad el. A hexózból ekvimoláris mennyiségű laktát, szén-dioxid, acetát vagy etanol képződik (Kandler, 1983). A heterofermentáló tejsavbaktériumok közé tartoznak a *Leuconostoc*-ok, illetve egyes *Lactobacillus*, *Oenococcus* és *Weissella* fajok (Carr et al., 2002; Jay et al., 2005). Két fő cukor fermentációs útról beszélhetünk a tejsavbaktériumok esetében.

Lactobacillus plantarum faj bemutatása:

A *Lactobacillus plantarum* egy sokoldalú tejsavbaktérium, amely gyakran megtalálható az emberi gyomor-bél traktusban, számos ételből izolálható, amelynek oka, hogy a szabályozófunkciókat kódoló gének nagy száma különböző körülményekhez való alkalmazkodást teszi lehetővé, számos cukor felvételéhez és hasznosításához szükséges enzimmal rendelkezik. A fajt fermentált tejtermékek előállításánál alkalmazzák, például kefir, sajtok, továbbá fermentált húskészítmények, fermentált zöldségek és italok készítéséhez (Todorov és Franco, 2010). Ennek a tejsavbaktérium fajnak a sejtjei pálca alakúak, 0.1-1.2 x 1.0-8.0 µm méretűek, egyenként vagy rövid lánc formájába rendeződve figyelhetőek meg. Heterofermentatív, fakultatív anaerob baktériumfaj, amely 15-45 °C-on képes növekedni, a faj számára optimális pH-tartomány a pH=4 és 9 közötti tartomány. Kísérletek során kimutatták, hogy a *Lactobacillus plantarum* faj törzsei általánosságban véve rezisztensek a kanamícin, sztreptomycin antibiotikumokra, illetve a faj néhány törzse rezisztenciát mutatott eritromicin, klóramfenikol, illetve tetraciklin antibiotikumokkal szemben is (Temmerman et al., 2003). A faj karakterizációját faj-specifikus PCR és 16S rDNS szekvenálással végezték. A *Lactobacillus plantarum* megemeli az mRNS expresszió szintjét a termelő nyálkában, mely hatására gátlódik az enteropatogén *Escherichia coli* faj törzseinek sejtekhez kötődése (Mack et al., 1999; Mack et al., 2003).

Lactobacillus mucosae faj bemutatása:

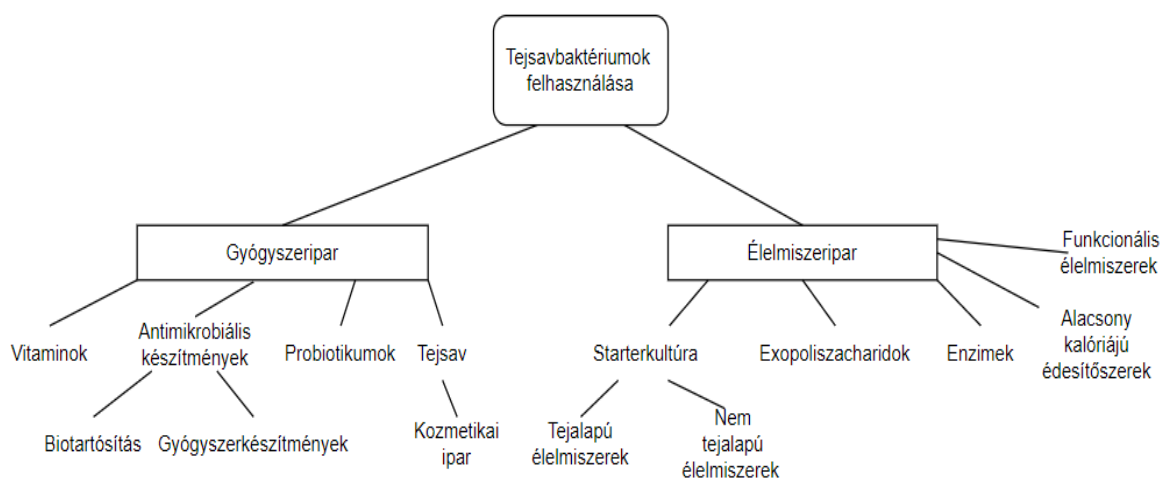
A *Lactobacillus mucosae* faj Gram-pozitív, kataláz-negatív, nem spóráképző, heterofermentatív 1x2-4 µm méretű baktérium pálcák, amelyek nem mutatnak mozgást és tejsavat képeznek metabolizmusuk során. 45 °C-on még növekednek, azonban 15 °C-on már nem mutattak növekedést. A faj bakteriális DNS-ének G+C tartalma 46 mol%. A sejtek

egyenként, esetenként párban vagy rövid láncot alkotva fordulnak elő, 37 °C-on 2 nap után anaerob körülmények között inkubált telepek MRS tápagaron 1-2 mm átmérőjű telepet képeznek, a telep sima felületű, fehér színű (Roos et al., 2000). A fajt 2000-ben izolálták elsőként sertés bélrendszeréből vett mintából. Ez a tejsavbaktérium faj képes megtapadni a bélnyálkahártyán, ezáltal képes gátolni más, patogén mikroorganizmusok megtapadását a nyálkahártyán, ez egy fontos kritérium, amit a probiotikus törzseknek teljesíteniük kell. Vankomicinnel, sztreptomicinnel szemben rezisztenciát mutatott a kísérletek során (de Moraes et al., 2017). A faj eddig összes vizsgált törzse exo-poliszacharidot termel, rendelkezik homológ nyálkakötő fehérjével. A faj által termelt exo-poliszacharid főként mannozil-maradékokból áll, illetve mannóz, glükóz és galaktóz alkotja. A *Lactobacillus mucosae* faj által termelt exopoliszacharidok probiotikus hatása fontos szerepet tölt be a baktérium stresszrezisztenciájában, továbbá a bél ökoszisztémájában belüli perzisztenciája szempontjából is (Fanning et al., 2012). A *Lactobacillus plantarum* megemeli az mRNS expresszió szintjét a termelődő nyálkában, mely hatására gátlódik az enteropatogén *Escherichia coli* faj törzseinek sejtekhez kötődése (Mack et al., 1999; Mack et al., 2003).

3.1.1. Tejsavbaktériumok felhasználása

Évszázadokon keresztül alkalmaztak tejsavbaktériumokat élelmiszerek biokonzerválásra, amelyek kritikus szerepet töltenek be így a tejek, húsok, zöldségek és különféle élelmiszerek erjesztésében, és elősegítik a felhasznált nyersanyag gyors savanyodását (Crowley et al., 2013). A tejsavbaktériumok által termelt gyenge szerves sav savas környezetet eredményez, amely korlátozza a gombák növekedését és számos patogén baktérium törzsszaporodását, így megelőzhető az ételek romlása (Ross et al., 2002). Számos tejsavbaktérium megtalálható tejtermékekben, fermentált húskészítményekben, például szalámiiban, fermentált zöldségekben, kovászos kenyérben (Korhonen, 2010), manapság pedig fontos szerepet töltenek be ezek a mikroorganizmusok a vegyi anyagok és gyógyszerek, illetve más termékek szintézisében (1. ábra). A Gram-pozitív baktériumok által termelt bakteriocinek többségét a tejsavbaktériumok termelik, ezek olyan hidrofób, riboszomálisan szintetizált fehérjék, amelyek baktériumölő tulajdonsággal rendelkeznek, a fehérje támadáspontja a baktériumok membránfehérjéi (Savadogo et al., 2006). Bizonyos tejsavbaktérium fajok a bélrendszeren áthaladva, megtapadásukat követően anyagcsere folyamataik során képesek olyan vitaminok szintézisére, melyek esszenciálisak az emberi szervezet számára, azonban nem termelődnek az emberi szervezetben. Számos tejsavbaktérium faj, például a *Lactobacillus plantarum* törzsei, rendelkeznek a riboflavin bioszintéziséhez szükséges

génekkel (Arena et al., 2014). A tejsavbaktériumok által termelt exopoliszacharidok széles körben felhasználhatók, kozmetikai és gyógyszeriparban, illetve élelmiszeriparban a bioemulgalószer, nehézfémek eltávolítására (Ismail és Nampoothiri, 2010), továbbá fontos szerepük van ezeknek a polimereknek a savanyú tejtermékek állományának kialakításában, mellyel elkerülhető az adalékanyagok alkalmazása (Freitas et al., 2011). Számos tejsavbaktérium faj törzsei képesek az élelmiszeriparban felhasznált enzimek bioszintézisére, például α -D-glükozidáz, β -D-glükozidáz, α -L-fukozidáz előállítására (Oakey et al., 1995). Természetes eredetű édesítőszer előállítására is felhasználhatók, ilyen például a *Lactobacillus fermentum* által előállított D-tagatóz, mely olyan különleges cukor, amelynek fizikai tulajdonságaiban, illetve ízében hasonlít a szacharózra, azonban sokkal alacsonyabb kalóriaértéket mutat, nem segíti elő a fogszuvasodást, nem idézi elő a vércukorszint növekedését (Jørgensen et al., 2004).

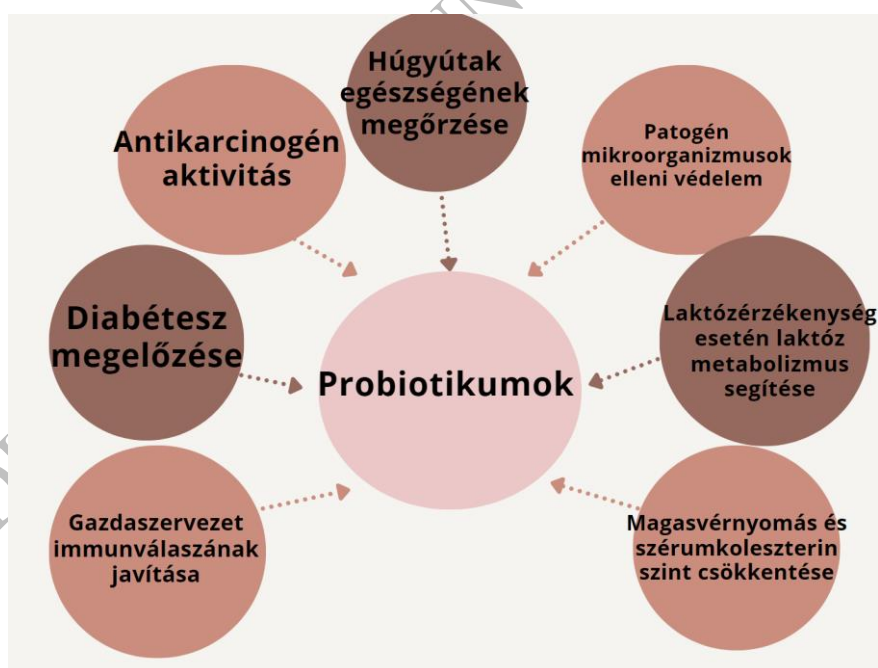


1. ábra Tejsavbaktériumok felhasználása (Florou-Paneri et al., 2013) nyomán, saját ábra

3.2. Probiotikumok

A probiotikumoknak olyan élő, nem patogén mikroorganizmusokat nevezünk, amelyeket megfelelő mennyiségben alkalmazva mikrobiális egyensúlyt javítják a gyomor-bél traktusban, pozitív hatással vannak a gazdaszervezet működésére (Borchers et al., 2009; Williams, 2010). A probiotikum szót az 1960-as években használták először és a görög „pro” szóból származik, melynek jelentése „elősegítése” és „biotikus”, melynek jelentése „élet”. A probiotikumok különböző mechanizmusokon keresztül fejtik ki jótékony hatásait, mint például a bél traktus pH-értékének csökkentésével, valamint a gazdaszervezet immunválaszának növelésével (Williams, 2010). Antimikrobiális aktivitások során képesek

megakadályozni a szervezetbe kerülő patogén baktériumok megtelepedését azáltal, hogy csökkentik a bél pH értékét, gátolják a káros baktériumok hámsejtekhez való tapadását, bakteriocinokat, szerves savakat és hidrogén-peroxidot termelnek. Európában az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság határozata szerint a probiotikumként alkalmazandó mikroorganizmusokban előforduló antibiotikum rezisztencia-determinánsokat a minősítési védelem igénylése előtt meg kell határozni (Gueimonde et al., 2013). A probiotikus baktériumok versengenek a patogén baktériumokkal a hámkötő helyekért, kölcsönhatásba lépnek a bél hámsejtjeivel, gátolják például a *Salmonella* és *E. coli* baktérium kolonizációját (Sherman et al., 2005). A probiotikumok specifikus törzsei befolyásolhatják a szerzett és a veleszületett immunrendszert, ezért fontos szerepet játszanak a betegségek legyőzésében, közvetlenül vagy közvetetten befolyásolják a hámsejteket, monocitákat, makrofágokat és limfociták különböző típusait (Walker, 2008). A probiotikumok törzstől függően csökkenthetik az allergén-specifikus IgE termelést, azáltal, hogy megemelik a hörgők nyálkahártyájában az IgA termelését (Borchers et al., 2009) a B-limfocitákra gyakorolt hatásuk révén, ezáltal csökkentik a légúti túlérzékenységet és gyulladást (Perdigon et al., 1999).



2. ábra Probiotikumok jótékony hatásai, saját készítésű ábra

A magasabb rendű gerincesek bélrendszere összetett ökoszisztéma, ahol a tápanyagok és a mikrobióta, illetve maga a gazdaszervezet sejtjei kölcsönhatásba lépnek egymással. A

bélrendszerben található baktériumközösségek fontos szerepet töltenek be az anyagcserében, patogének elleni védelemben. Számos betegség hozható összefüggésbe a bélmikrobióta károsodásával, az egészség megőrzése érdekében és a betegségek megelőzése, vagy éppen gyógyítása érdekében egyre nagyobb az érdeklődés a probiotikumok iránt. Az élelmiszeripari, illetve agrárszektorban felhasználásra szánt baktériumtörzsek egyik legfontosabb kiválasztási kritériuma az, hogy emberi fogyasztásra alkalmas legyen, szervezetbe kerülve ne okozzon kárt. Az antibiotikum-rezisztencia a biztonság elsődleges szempontja a potenciálisan probiotikumként felhasználandó baktériumok esetében. A probiotikumok nem tartalmazhatnak antibiotikum-rezisztencia géneket, illetve amennyiben tartalmaznak, nem lehetnek mobilizálhatók ezek a gének más baktériumok számára. A belső rezisztencia kromoszomálisan kódolt, horizontális géntranszferrel nem átvihető, nem jelenthet kockázatot más, nem patogén baktériumok számára. A probiotikumok a szervezetünkbe étrendkiegészítők, tabletták, kapszulák, fermentált élelmiszerek, leggyakrabban joghurtok vagy tejitalok formájában kerülnek be. Az optimális napi adagolása a baktériumoknak emberi székletből történő kimutatás alapján 10^9 baktérium kolónia képző egység per g vagy mL (Butel, 2014). A probiotikus termékek akár egyetlen mikroorganizmust vagy több faj keverékét tartalmazhatják. A kommenzális mikroflóra probiotikumokkal történő megerősítése kulcsszerepet játszik az immunrendszer kiegyensúlyozott működésében, növeli a patogén mikrobákkal szembeni ellenállóképességet, javítja az emésztőrendszer működését, valamint a potenciálisan rákkeltő anyagok eltávolítását elősegíti (Tannock, 2003). Veszélyforrást jelenthet a tejsavbaktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája, illetve a baktériumok között megvalósuló horizontális géntranszfer általi rezisztencia-determinánsok átadása más, patogén organizmusokra és a kommenzális bélmikrobiótára egyaránt, így fontos felmérni a törzsek antibiotikum rezisztenciáját.

Egy baktériumot abban az esetben lehet probiotikumként alkalmazni, amennyiben a következő kritériumoknak megfelel (Papp-Bata és Szakály, 2021) nemzetség, faj és törzs szinten egyaránt:

- Nemzetség, faj és törzs szintjén meghatározott faj szintű azonosítás:
 - Biokémiai vizsgálatokkal: különböző szénforrások melletti növekedés vizsgálata, Gram-teszt, kataláz-, nitrátreduktáz- és ureázteszt
- Genotipizálás vizsgálatok: 16s rRNS-gén szekvenálása, repetatív PCR vizsgálatok, random PCR (RAPD), illetve pulzálómezős elektroforézis

(PFGE) (Borchers et al., 2009; Marchesi et al., 2016; de Melo Pereira et al., 2018).

- Biztonságos klinikai és élelmiszerben való felhasználása:
 - o nem patogén
 - o nem roncsolja a bélnyálkahártyát
 - o nem hordoz transzferálható antibiotikum rezisztencia géneket
 - o érzékeny antibiotikumokra
 - o nem konjugál epesavakat
- Képes túlélni a bélben való áthaladást, ellenáll a savas közegnek és epe toleráns. Ellenáll az emberi szervezet kedvezőtlen körülményeinek, mint például a nyálenzimeknek, illetve az alacsony pH-nak
- Képes megtapadni a nyálkahártya felületére, képes megtelepedni a bélrendszerben, illetve a vaginában
- Antimikrobiális anyagokat termel
- Képes antagonizálni a patogén mikrobákat
- Klinikailag validált és dokumentált pozitív egészségügyi hatásokkal rendelkezik
- Stabil a feldolgozás és tárolás során
- Hozzájárul a gazdaszervezet egészségéhez
- Nem vált ki allergiát, nem mutagén

3.2.1. Probiotikumok állati takarmányokban

Az antibiotikumok megjelenése és alkalmazása jelentős hatással volt az állatok egészségére és jólétére. A fertőzések kezelésére alkalmazott antibiotikumok alkalmazása mellett kimutatták, hogy az állati takarmányhoz alacsony koncentrációban adagolt antibiotikumok összefüggésben állnak az állatok egészségügyi állapotának javulásával, azonban a bélben található természetes mikroflóra pusztulásával jár. Számos környezeti tényező, illetve az állatok takarmányának összetétele befolyásolja a haszonállat állomány egészségének állapotát, bélmikrobióta összetételét és funkcióit, illetve a megfelelő emésztés megőrzését. Kutatások kimutatták, hogy a takarmányalapú étrendről a magas, könnyen fermentálható étrendre történő áttérés a bélmikrobióta jelentős változását idézi elő, továbbá megnöveli a bendő acidózis kockázatát (Chaucheyras-Durand és Durand, 2010). A probiotikumokat széles körben alkalmazzák a haszonállatok táplálékának kiegészítőjeként, mivel csökkentik a megbetegedések kockázatát, ellenállóságot biztosítanak a betegségekkel szemben, továbbá növekedésserkentő hatásaik is vannak, illetve befolyásolják a hámsejtek aktivitását, ezáltal

csökkentik a lehetőségét a patogén kórokozók megtapadásnak (Hooper et al., 2002; Collins et al., 2009). Intenzív gazdálkodás során bevett gyakorlat, hogy a haszonállatokat az anyaállattól elszakítva, „tisztá” környezetbe helyezték, ezzel megakadályozva az egészséges mikrobióta kialakulását és csökkentve a passzív immunitás megszerzését. Ezek az állatok az átlagostól nagyobb eséllyel betegednek meg, nagyobb stressznek vannak kitéve a szállításukból, illetve a szállítás közbeni hőmérséklet-ingadozásból, továbbá a táplálkozásukból adódóan. Kimutatták, hogy az említett stresszfaktorok a bélmikrobióta egyensúly-hiányát idézik elő (Tannock és Savage, 1974). A probiotikumok alkalmazása a fiatal, stresszes, antibiotikumokkal kezelt állatok mikrobiótájának helyreállítását segíti elő, annak érdekében, hogy az állatok ellenálljanak a fertőző betegségeknek (Rantala és Nurmi, 1973). A probiotikus baktériumokat tartalmazó táplálékkiegészítők széles körben kaphatók, azonban első sorban egygyomrú állatok számára lettek kifejlesztve, a kérődzőknél az alkalmazásuk bonyolultabb, gyakran attól függ, hogy a cél az acidózis leküzdése, súly növekedése vagy csökkentése, vagy a betegségek előfordulásának csökkentése vagy a metántermelés csökkentése (Krehbiel et al., 2003). Kutatások bizonyították, hogy a haszonállatok étrendjének kiegészítése probiotikus tulajdonságú baktériumokkal elősegíti a betegségekkel szembeni védekezést, javítják az immunválaszt, serkenti az állatok növekedését.

3.3. Antibiotikumok

Az antimikrobiális készítmények a gyógyászatban alkalmazott egyik legfontosabb készítmények, amelyek jelentős mértékben hozzájárultak az embereket fenyegető fertőző betegségek leküzdésében. A penészgombák antibakteriális tulajdonságai már az ókorban is ismertek voltak, azonban az első antibiotikumot, a penicillint, Sir Alexander Fleming angol bakteriológus fedezte fel 1928 szeptemberében, amelyet talajból izolált *Penicillium notatum* gombából nyert ki (de Melo Pereira et al., 2018). Az antibiotikumokat korábban egy mikroorganizmus által termelt, más mikroorganizmus növekedését gátló anyagnak definiálták. A mai meghatározás azonban változott, mivel szintetikus módon is előállíthatók az antibiotikumok, így a definíció módosult, több jelentéssel bír napjainkban; egyik megfogalmazás szerint az antibiotikumok egy mikroorganizmus által vagy hasonló, teljesen vagy részben kémiai szintézissel előállított anyagok, amelyek alacsony koncentrációban gátolják más mikroorganizmusok növekedését. A másik megfogalmazás szerint antibiotikumnak nevezhető bármely antimikrobiális tulajdonságú anyag (Aminov, 2010). Az antibiotikumok nem teljesen szelektívek antibakteriális hatásukban, hiszen miközben

antagonizálják a patogén baktériumokat, aközben például a gyomortraktusban található hasznos mikrobákat is előlhetik, amennyiben azok érzékenyek az említett antibiotikumra (Etebu és Arikekpar, 2016; Mohr, 2016).

3.3.1. Ampicillin

β -laktám/ β -laktamáz inhibitor komplex, amely széles spektrumon Gram-pozitív és Gram-negatív, illetve anaerob baktériumok ellen alkalmazott antibiotikum, amely vízben kismértékben oldódik (Walsh, 2003). Az ampicillin gátolja a baktériumok sejtfal szintézisét azáltal, hogy kötődik a penicillinkötő fehérjékhez, amelyek a sejtfal kialakításáért felelős enzimek. Az ampicillin, mint minden penicillin, az acil-D-alanil-D-alanin szerkezeti analógjaként működik és acilálja a transzpeptidáz enzimet, amely a sejtfal fő alkotóeleme, a peptidoglikán képződésének végső szakaszáért felelős, amely a bakteriális sejtfal fő alkotóeleme (P. I. Rafailidis et al., 2007).

3.3.2. Eritromicin

Az eritromicin a makrolid antibiotikumok csoportjába tartozik, 14 tagú laktongyűrűből áll, melyhez cukoregységek csatlakoznak, vízben nem, azonban metanolban oldódó antibiotikum. A legtöbb Gram-pozitív baktérium ellen alkalmazható, működése pH-függő, a pH tartományt 8.5-re emelve a leghatékonyabb a működése, ezért orálisan alkalmazzák legtöbbször. Működése során a bakteriális riboszóma 50S alegységéhez kötődve szelektíven gátolja a fehérjék szintézisét. A klóramfenikollal és az eritromicinnel szemben kialakult rezisztencia a 23S rRNS ugyanazon régióján belül különböző bázisok metilációjával alakulhat ki (P. I. Rafailidis et al., 2007).

3.3.3. Kanamicin

Aminoglikozid antibiotikum, amely amino-cukrokat tartalmaz a szerkezetében. Fermentációval előállított kanamicin A vízoldható, míg a kanamicin-szulfát vízoldhatósága pH-függő, pH=7-en oldódik vízben. Széles spektrumú, Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok ellen egyaránt alkalmazható, már kis koncentrációban is kifejti bakteriocid hatását (Denyer et al., 2008). Ez az antibiotikum a fehérjeszintézist gátolja a baktériumokban úgy, hogy a 30S és 50S riboszomális alegységgel lép kölcsönhatásba (Denyer et al., 2008).

3.3.4. Klóramfenikol

A klóramfenikol, vízoldható (DAVIS, 1988), májban metabolizálódó antibiotikum, amely Gram-pozitív baktériumok ellen hatásos, széles körben alkalmazható, behatolhat emlísejtekbe is, ezért alkalmazható intracellurális kórokozók, mint például *Salmonella typhi*, ellen is. Szelektíven gátolja a fehérjeszintézist a bakteriális riboszómában azáltal, hogy

az 50S alegységben a 23S rRNS-t magába foglaló A kötőhelyre kötődik. A klóramfenikol négy lehetséges optikai izomerje közül csak a D-treoform aktív. (Feder et al., 1981)

3.3.5. Sztreptomycin

A sztreptomycin olyan vízben oldódó aminoglikozid antibiotikum, amely a baktérium riboszóma 30S alegységéhez kapcsolódva gátolja a fehérjeszintézist, illetve a kodonok félreolvasását okozza, amely során az uracilt adeninnek vagy citozinnek olvassa, a citozint pedig adeninnek a sejt, melynek hatására hibás fehérjék felhalmozódása történik a sejten belül, amely végzetes a sejtre nézve, illetve a sejt membránja károsodik a folyamat során (Brock, 1961; Denyer et al., 2008). Napjainkban elsősorban Gram-negatív aerob baktériumok ellen alkalmazzák, eredetileg széles spektrumon fejtette ki hatását Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok ellen egyaránt, azonban ez az antibiotikum rezisztencia kialakulása végett csökkent (Denyer et al., 2008).

3.4. Antibiotikum rezisztencia

Az antibiotikum rezisztencia a baktérium sejtek azon képességét jelenti, mely megakadályozza/csökkenti a bakteriocid vagy bakteriosztatikus hatását az antibiotikumnak, ezáltal megóvva a sejteket az antibiotikumok okozta károsodástól (Waters és Tadi, 2020). Az antibiotikumok használatának következtében kialakultak olyan mikroorganizmusok, amelyek rezisztensek egyes antibiotikumokra, ennek oka részben az antibiotikumok évtizedeken át tartó túlzott és néhol nem indokolt használata, illetve a nem előírtak szerinti szedése (Munita és Arias, 2016). Napjainkban a baktériumok antibiotikum rezisztenciája hatalmas problémát jelent a közegészségügyben, illetve az Egészségügyi Világszervezet (WHO) az antibiotikum rezisztenciát a 21. század három legnagyobb egészségügyi veszélyei közé sorolta. Az antimikrobiális vegyületek felfedezése és terápiás használata fertőzések kezelésére forradalmasította a modern gyógyászatot, az antibiotikumok alkalmazása az egyik legfontosabb orvosi kezeléssé vált a komplex orvosi beavatkozások esetén, mint például a műtétek, szervtranszplantáció, illetve rákos megbetegedések esetén.

A legtöbb antibiotikum természetes eredetű, aminek köszönhetően a mikroorganizmusok fejlődése és környezethez való adaptációja során a túlélésük érdekében megtanulták feldolgozni ezen anyagokat. A baktériumokról általánosságban elmondható, hogy könnyen adaptálódnak a környezetükben előállt változásokhoz, mely lehetővé teszi számukra, hogy a létezésüket fenyegető veszélyekre, mint például az antibiotikumok, ellenállóak legyenek. Annak érdekében, hogy a káros molekulahatásokat képesek legyenek kiküszöbölni ősi mechanizmusokat fejlesztettek ki, melynek hatására belső rezisztenciát alakítottak ki

bizonyos antimikrobiális szerek ellen, így azok jelenlétében is képesek életben maradni. Evolúciós szempontból két mechanizmust alkalmaztak az antibiotikumokhoz való alkalmazkodáshoz: a gének mutációit felhasználva képesek a vegyületek hatásmechanizmusainak módosítására, illetve rezisztencia-determinánsokat kódoló idegen DNS megszerzését horizontális géntranszfer segítségével.

Négy formája alakult ki az antibiotikum rezisztenciának:

- A) Természetes eredetű rezisztencia: A rezisztencia kialakulása nem az antibiotikumok alkalmazása végett alakult ki ennél a típusnál, hanem a rezisztencia oka a mikroorganizmus szerkezeti tulajdonságai miatt alakult ki. A baktérium ebben az esetben nem rendelkezik a cél antibiotikum szerkezettel, melynek következtében az antibiotikum nem képes támadáspontot találni a mikrobán a szerkezetéből adódóan. Például a Gram-negatív baktériumok esetén a vankomicin nem képes a mikroba külső membránján átjutni, ezáltal a mikroba érzéketlen az antibiotikum kezelésre (Mathur és Singh, 2005; Hasan és Al-Harmoosh, 2020).
- B) Szerzett rezisztencia: Ebben az esetben a rezisztencia mikroorganizmus fő kromoszómájából vagy extra kromoszómastruktúrákból eredeztethető, mint például plamidok vagy transzpozonokból, ezen kromoszómális rezisztencia olyan véletlenszerű mutációk eredménye, melyek megváltoztatják a mikroba kromoszómáját és olyan gének alakulnak ki a mikrobában, melyek befolyásolják a gyógyszer aktivitását, aminek hatására a antimikrobiális-gyógyszer jelenlétében is életképes marad a sejt (Antonoplis et al., 2019). A plazmidok olyan szegmensei a DNS-nek, amelyek képesek a kromoszómális DNS-től függetlenül, önállóan is replikálódni, illetve felelős az antimikrobiális szerekkel szembeni enzimek szintéziséért (Munita és Arias, 2016). A mutációk kialakulásai kémiai és fizikai tényezők hatására mennek végbe, továbbá a baktériumsejtek csökkent permeabilitása, illetve a gyógyszer célpontjának megváltozása a sejtben miatt alakul ki a rezisztencia (Thomas és Frost, 2014). Jellemzően a mutációk által szerzett rezisztencia negatív hatással van a sejt homeosztázisára, ezért a sejt csak antibiotikum jelenlétében képes fenttartani a rezisztenciát. Az antibiotikum megjelenésével az antibiotikum megszünteti az érzékeny populációt, így a domináns, antibiotikumra nem érzékeny sejtek maradnak fenn.
- C) Keresztrezisztencia specifikus rezisztencia: Egyes mikrobák rezisztensek bizonyos antibiotikumra, amely azonos vagy hasonló mechanizmusokkal működnek, ennek

hatására hasonló szerkezetű antibiotikumokkal szemben is rezisztensek. Például eritromicin, neomicin és kanamicin rezisztencia (Webber és Piddock, 2003).

D) Multi-drog és más típusú rezisztenciák: Többszörösen rezisztens fajok olyan patogének, amelyek rezisztensek antibiotikumokkal szemben, ez biztosítja, hogy a baktériumokat egyetlen gyógyszer sem eliminálja (Jahne et al., 2015; Etebu és Ariekpar, 2016). A gyógyszerek nem megfelelő kezelési alkalmazása előidézhetheti a multirezisztens patogén baktériumok kialakulását. Ezen baktériumok több gyógyszerrezisztenciát kódoló génnel rendelkeznek az R-plazmidon (Alanis, 2005).

HADHÁZI VIVIEN JENNI SZAKDOLGOZAT

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált mikroorganizmusok

A kísérleteim során alkalmazott tejsavbaktériumokat az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: Felhasznált tejsavbaktérium törzsek

Törzs neve	Törzs sorszáma
<i>Lactobacillus plantarum</i>	OR17, OR23, OR28, OR48
<i>Lactobacillus mucosae</i>	AT3, AT6, AT9, TS29, TS31, TS35, TS43, TS44, TS47, TS54, TS53

4.2. Felhasznált tápközegek

4.2.1. MRS tápleves

A por formájában lévő MRS táplevest analitikai mérlegen mértem ki úgy, hogy 40 darab kémcsőbe elegendő mennyiségű tápleves jusson. A gyártói utasítás alapján 1 liter desztillált vízhez 55.2 gramm poralapú táplevest kell adagolni a megfelelő koncentráció elérése érdekében. 55 darab kémcsőhöz 600 ml táplevest készítettem, melyhez 33.12 gramm tápleves port mértem ki mérleg segítségével egy zárható, csavaros tetejű üvegedénybe, amelyhez mérőhenger segítségével kimért 600 ml desztillált vizet öntöttem. Rázással homogenizáltam az elegyet, amíg teljes mértékben feloldódott a por a folyadékban és homogén elegyet kaptam. 55 darab kémcsőbe osztottam szét automata pipetta segítségével úgy, hogy minden kémcsőbe 9 ml folyékony tápleves került, a kémcsöveket feliratoztam. Ezt követően a táplevest autoklávban sterilizáltam 20 percen keresztül 120 °C-on és 1 Pa nyomáson.

4.2.2. MRS tápagar

Mérőhengerrel kimért 500 ml desztillált vízhez, zárható, csavaros tetejű üvegedénybe 27,6 gramm, analitikai mérlegen kimért poralapú MRS (Sigma-Aldrich) táplevest adtam, melyhez analitikai mérleg segítségével kimért 9 g agar-agar port (Bacteriological Agar, VWR) kevertem hozzá. Ezt követően autoklávban 20 percen át, 120 °C-on és 1 Pa nyomáson sterilizáltam az oldatot, óvatos rázással homogenizáltam, majd Petri-csészékbe adagoltam az elegyet, szilárdulást követően használtam fel.

4.3. Felhasznált antibiotikumok

A kísérleteim során MRS táplevest készítettem, amelybe belekevertem az antibiotikumokat. A megfelelő antibiotikum koncentrációkat analitikai mérleg segítségével mértem ki Eppendorf csövekbe, majd beoldottam és sterilen szűrtem őket. Az irodalomban

meghatározott antibiotikum koncentrációkat alkalmazva (Rychen et al., 2018) elkészítettem a megfelelő koncentrációjú antibiotikum oldatokat, melynek koncentrációi az 2. táblázatban találhatóak.

2. táblázat: antibiotikum koncentrációk (Rychen et al., 2018)

Ampicillin	2 mg/L
Eritromicin	64 mg/L
Sztreptomicin	64 mg/L
Kanamicin	1 mg/L
Klóramfenikol	4 mg/L

HADHÁZI VIVIEN JENNI SZAKDOLGOZAT

4.4. Alkalmazott módszerek

4.4.1. Fagyasztott baktériumok felélesztése

A $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt tejsavbaktérium törzseket folyékony MRS táplevesbe oltottam, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam. A fagyasztóból kivéve hagytam kiolvadni a törzseket, majd vortexeltem és automata pipetta segítségével $100\text{ }\mu\text{L}$ mennyiséget az előre autoklávozott és feliratozott 9 mL MRS táplevest tartalmazó kémcsövekbe adagoltam, majd óvatos rázással homogenizáltam. 2 napon keresztül, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam a kémcsövekben a tejsavbaktérium törzseket. Az inkubálási időt követően azt tapasztaltam, hogy a folyékony tápközegben lévő tejsavbaktérium törzsek zavarossá tették a táplevest, amely azt jelezte, hogy megfelelően szaporodtak a baktériumok.

4.4.2. Sejtszám meghatározás

A két napos, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt inkubálást tízszeres hígítást készítettem a sejtszám meghatározásához. A kémcsövek tartalmát vortexeltem, Eppendorf csövekbe $100\text{ }\mu\text{L}$ mintához $900\text{ }\mu\text{L}$ vizet adtam, majd Bürker kamra segítségével $40\times$ -es nagyítással fénymikroszkóppal megszámláltam az oldatban található sejteket 10 darab négyzetben, majd átlagoltam a kapott számokat. A Bürker-kamrát minden számolás előtt desztillált vízzel öblítettem. Ezt követően megszoroztam tízzel az eredményt a korábbi hígítás miatt, illetve $4\cdot 10^6$ -tal a Bürker-kamra térfogatából adódóan, így kapva meg, 1 mL szuszpenzió sejtszámát.

4.4.3. Antibiotikum érzékenység vizsgálata

Korongdiffúziós módszer

Az előre elkészített és megszilárdult MRS agarra a két napos inkubációt követően $100\text{ }\mu\text{L}$ folyékony táplevest pipettáztam automata pipettával steril fülke alatt, majd Bunsen-égőbe tartott, steril szélesztőbottal egyenletesen eloszlattam a tejsavbaktérium szuszpenziót az agar felszínén. A szűrőpapír korongokat átittam a megfelelő koncentrációra beállított antibiotikum oldatokból $8\text{--}8\text{ }\mu\text{L}$ mennyiséggel és a tejsavbaktérium szuszpenziót tartalmazó agar felületére helyeztem a korongokat. Törzsenként 5 antibiotikum hatását vizsgáltam. A 2 napos, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os inkubálást követően lemértem a gátlási zónát tolmérő segítségével.

Abszorbancia mérés

96 well -es plateket használtam az abszorbancia mérés elvégzéshez. 100 mg/mL koncentrációjú sterilen szűrt szteptomycin (BioChemica), klóramfenikol (BioChemica), ampicillin (BioChemica), eritromicin (Sigma-Aldrich) és kanamicin (BioChemica)

törzsoldatokat készítettem. Az elkészített törzsoldatok felhasználásával 5 ml MRS tápleves antibiotikum koncentrációját beállítottam az irodalomban leírt (Rychen et al., 2018) adatoknak megfelelően. A plate-k összeállítását fülke alatt végeztem, ügyeltem arra, hogy a már betöltött, illetve a betöltésre váró well-ek ne szennyeződjenek be. Minden törzs esetén tiszta pipettaheggyel dolgoztam. 1 well-be 135 μ L MRS tápleves oldat került, amely már tartalmazta az antibiotikum oldatot, és 15 μ L baktérium szuszpenzió. Pozitív kontrollként minden törzs esetében az első well-be nem került antibiotikum csak MRS tápleves és a vizsgált törzs sejtsuszpenziója. A méréshez felhasznált törzseket vortexeltem. A betöltött plate-eket két napig, 37 °C-on inkubáltam, mielőtt a mérést elvégeztem. Az abszorbancia mérés vizsgálatához FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader eszközt használtam, a mérést 620 nm hullámhosszon, 10 s orbitális rázást követően, 28 °C-on végeztem.

A plate-ek felépítése a 3. táblázatban látható. A mérést három párhuzamosban végeztem el.

3. táblázat Microplate felépítése az abszorbancia vizsgálatok során

KONTROLL		Ampicillin		Eritromicin		Kanamicin		Szreptomycin		Klóramfenikol	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OR 17	OR 23	OR 17	OR 23	OR 17	OR 23	OR 17	OR 23	OR 17	OR 23	OR 17	OR 23
OR 28	OR 48	OR 28	OR 48	OR 28	OR 48	OR 28	OR 48	OR 28	OR 48	OR 28	OR 48
AT3	AT 6	AT3	AT 6	AT3	AT 6	AT3	AT 6	AT3	AT 6	AT3	AT 6
AT 9	TS 29	AT 9	TS 29	AT 9	TS 29	AT 9	TS 29	AT 9	TS 29	AT 9	TS 29
TS 31	TS 35	TS 31	TS 35	TS 31	TS 35	TS 31	TS 35	TS 31	TS 35	TS 31	TS 35
TS 43	TS 44	TS 43	TS 44	TS 43	TS 44	TS 43	TS 44	TS 43	TS 44	TS 43	TS 44
TS 47	TS 54	TS 47	TS 54	TS 47	TS 54	TS 47	TS 54	TS 47	TS 54	TS 47	TS 54
TS 55	negatív kontroll	TS 55	negatív kontroll	TS 55	negatív kontroll	TS 55	negatív kontroll	TS 55	negatív kontroll	TS 55	negatív kontroll

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. Bürker-kamrás számolás eredményei

4. táblázat Bürker-kamra számolás eredményei 10 párhuzamos számolás során

Törzsek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OR 17	7	10	18	23	9	14	20	12	16	14
OR 23	27	17	18	30	23	28	16	25	26	24
OR 28	25	26	25	18	12	12	15	16	8	14
OR 48	11	18	17	24	27	23	30	29	30	22
AT 3	17	18	22	23	20	18	25	20	21	19
AT 6	40	44	42	52	60	44	47	61	58	64
AT 9	27	24	30	39	29	33	35	39	41	40
TS 29	59	68	60	61	57	54	52	54	62	60
TS 31	29	28	36	43	37	41	37	43	40	42
TS 35	38	28	35	38	36	43	27	36	25	37
TS 43	45	37	38	45	50	39	55	50	52	55
TS 44	40	36	44	30	38	46	53	45	50	42
TS 47	23	13	24	27	24	23	19	29	20	18
TS 54	20	19	25	27	26	21	27	33	35	34
TS 55	40	35	32	35	44	52	55	59	51	50

Az átlagokat 10x-es hígítással, illetve a Bürker-kamra térfogatával ($4 \cdot 10^6$) való szorzást követően megkaptam a sejtkoncentrációkat (5. táblázat).

5. táblázat Bürker-kamra térfogatra korrigált sejtszámok

Törzs	Sejtszám
OR 17	$5,72 \cdot 10^8$
OR 23	$9,36 \cdot 10^8$
OR 28	$6,84 \cdot 10^8$
OR 48	$9,24 \cdot 10^8$
AT 3	$8,12 \cdot 10^8$
AT 6	$2,05 \cdot 10^9$
AT 9	$1,35 \cdot 10^9$
TS 29	$2,35 \cdot 10^9$
TS 31	$1,50 \cdot 10^9$
TS 35	$1,37 \cdot 10^9$
TS 43	$1,86 \cdot 10^9$
TS 44	$1,70 \cdot 10^9$
TS 47	$8,80 \cdot 10^8$
TS 54	$1,07 \cdot 10^9$
TS 55	$1,81 \cdot 10^9$

A vizsgálatban felhasznált törzsek mindegyike felszaporodott, szabad szemmel látható opálosodást, a tápleves zavarosodását okozta. A sejtszámolás eredményei 10^8 és 10^9 sejt/mL eredményt adtak, tehát a törzsek megfelelően szaporodtak a kísérlet elvégzéséhez.

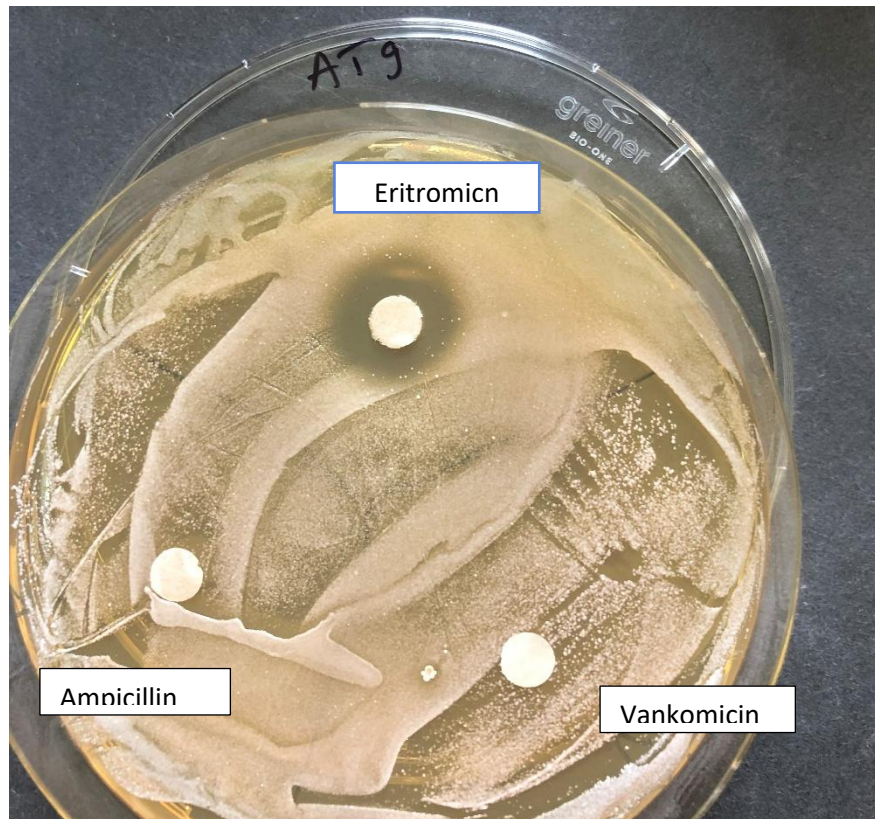
5.2. Korong diffúziós vizsgálat eredményei

A korondiffúziós módszerrel kapott eredményeimet a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat Korong diffúziós módszerrel kapott feltisztulási zónák átmérőinek hossza

	Feltisztulási zóna átmérője	Antibiotikum
OR 17	1,1 cm	Eritromicin
OR 17	2,2 cm	Ampicillin
OR 23	0,7 cm	Ampicillin
OR 23	1 cm	Eritromicin
OR 28	1,2 cm	Ampicillin
OR 28	1,3 cm	Eritromicin
OR 48	0,9 cm	Eritromicin
OR 48	1,1 cm	Ampicillin
AT 3	0,7 cm	Eritromicin
AT 6	1,2 cm	Eritromicin
AT 9	1,4 cm	Eritromicin
TS 29	0,9 cm	Eritromicin
TS 31	0,7 cm	Ampicillin
TS 31	0,9 cm	Eritromicin
TS 35	0,8 cm	Eritromicin
TS 43	0,85 cm	Eritromicin
TS 44	0,9 cm	Eritromicin
TS 47	0,7 cm	Eritromicin
TS 55	0,6 cm	Eritromicin
TS 55	0,6 cm	Ampicillin

A TS 54-es törzs a vizsgálat közben beszennyeződött, így erre a törzsrre nem kaptam eredményt a korong diffúziós vizsgálat során. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy az összes vizsgált tejsavbaktérium törzs érzékenységet mutatott az ampicillin és az eritromicin antibiotikumokkal szemben. A mérések során a klóramfenikol, sztreptomycin és vankomicin oldattal átitatott szűrőpapír korongok nem eredményeztek gátlási zónát, ez arra engedne következtetni, hogy a baktériumok rezisztensek ezekkel az antibiotikumokkal szemben, mivel nem gátolta a baktérium törzsek növekedését.



3. ábra Az AT 9-es törzs gátlási zónája eritromicin alkalmazása során

A 3. ábrán látható, ahogyan az AT 9-es törzs látványos gátlási zónát mutat az eritromicinnel átitatott szűrőkorong alkalmazásakor. A törzs az ampicillinre, illetve a vankomicinre rezisztenciát mutatott.

Az eredmények megerősítése érdekében Filtermax készülék segítségével megmértem a törzsek abszorbanciáját is az egyes antibiotikumok jelenlétében megegyező sejtkoncentrációnál.

5.3. Abszorbancia mérés eredményei

A microplate-es abszorbancia méréseket három különböző alkalommal végeztem el, ezek közül az utolsó két mérés az első méréshez képest több mint fél év különbséggel történt. 15 törzssel dolgoztam (7-10. táblázatok), így a 16. helyre (H2 well) a negatív kontroll került, melynél 0,1 körüli abszorbancia értéket mértem, az eredmények kiértékelésénél ezt az értéket vettem referenciaként. Akkor történt növekedés, amikor ennél nagyobb értéket kaptam. Ideális esetben a pozitív kontroll minták mindegyike az 1,0 abszorbancia értéket közelítette meg, vagy meg is haladta. Az 1,0 körüli abszorbancia értékeknél volt szabad szemmel is látható növekedés a mikrolemezen, ezek a törzsek opállossá tették a táplevest.

5. táblázat Microplate elrendezése. (Az „ng” jelölés a negatív kontrollt jelenti)

KONTROLL		Ampicillin		Eritromicin		Kanamicin		Sztreptomicin		Klóramfenikol	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OR 17	OR 23	OR 17	OR 23	OR 17	OR 23	OR 17	OR 23	OR 17	OR 23	OR 17	OR 23
OR 28	OR 48	OR 28	OR 48	OR 28	OR 48	OR 28	OR 48	OR 28	OR 48	OR 28	OR 48
AT 3	AT 6	AT 3	AT 6	AT 3	AT 6	AT 3	AT 6	AT 3	AT 6	AT 3	AT 6
AT 9	TS 29	AT 9	TS 29	AT 9	TS 29	AT 9	TS 29	AT 9	TS 29	AT 9	TS 29
TS 31	TS 35	TS 31	TS 35	TS 31	TS 35	TS 31	TS 35	TS 31	TS 35	TS 31	TS 35
TS 43	TS 44	TS 43	TS 44	TS 43	TS 44	TS 43	TS 44	TS 43	TS 44	TS 43	TS 44
TS 47	TS 54	TS 47	TS 54	TS 47	TS 54	TS 47	TS 54	TS 47	TS 54	TS 47	TS 54
TS 55	n.g	TS 55	n.g	TS 55	n.g	TS 55	n.g	TS 55	n.g	TS 55	n.g

8. táblázat Első mérést követően kapott abszorbanciaértékek (Kék színnel jelölve a pozitív kontroll értékei, szürke színnel jelöltem a *Lactobacillus platarum* faj törzseit, melyek nem nőttek fel, így nem értékeltem a kapott abszorbanciákat. Sárgával jelölve a rezisztenciát nem mutató well-ek, zölddel a negatív kontroll értékei)

1. mérés

KONTROLL		Ampicillin		Eritromicin		Kanamicin		Sztreptomicin		Klóramfenikol		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,101	0,1	0,097	0,652	0,1	0,103	0,089	0,09	1,499	0,091	0,098	0,099
B	0,099	0,102	0,102	0,098	0,098	0,101	0,089	0,088	0,091	0,09	0,099	0,1
C	1,254	1,284	0,103	0,11	0,103	1,296	1,253	1,232	0,132	0,532	0,105	0,104
D	1,264	1,312	0,106	0,111	0,102	0,102	1,284	1,248	0,154	1,489	0,106	0,105
E	1,24	0,956	0,113	0,762	0,104	0,108	1,241	0,705	1,301	0,691	0,107	0,103
F	1,309	1,236	0,118	0,115	0,106	0,106	1,234	1,185	1,284	1,107	0,115	0,109
G	1,14	1,298	0,152	0,107	0,104	0,103	1,124	1,254	1,3	0,415	0,119	0,106
H	1,187	0,107	0,114	0,104	0,106	0,102	1,15	1,135	0,909	0,095	0,215	0,105

9. táblázat Második mérés során kapott abszorbancia értékek (Kék színnel jelölve a pozitív kontroll értékei, szürke színnel jelöltem a *Lactobacillus platarum* faj törzseit, melyek nem nőttek fel, így nem értékeltem a kapott abszorbanciákat. Sárgával jelölve a rezisztenciát nem mutató well-ek, zölddel a negatív kontroll értékei)

2. mérés

KONTROLL		Ampicillin		Eritromicin		Kanamicin		Sztreptomicin		Klóramfenikol		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,201	0,218	0,173	0,162	0,157	0,158	0,167	0,183	0,175	0,188	0,187	0,229
B	0,182	0,255	0,112	0,102	0,159	0,183	0,227	0,324	0,248	0,282	0,178	0,186
C	1,188	1,289	0,099	0,135	1,172	1,156	1,202	1,286	1,228	1,23	0,995	0,702
D	1,242	1,379	0,264	0,618	1,248	1,277	1,282	1,381	1,283	1,372	1,025	0,947
E	1,292	1,043	0,362	0,59	1,293	0,808	1,296	0,815	1,262	0,766	1,103	0,384

F	1,128	1,288	0,34	0,301	1,162	1,234	1,235	1,232	1,207	1,222	1,075	0,872
G	1,093	1,275	0,295	0,301	1,109	1,196	1,22	1,248	1,165	1,24	1,004	0,904
H	1,098	0,077	0,311	0,082	1,166	0,085	1,193	0,085	1,175	0,089	0,903	0,189

10. táblázat 3. mérés során kapott abszorbancia értékek (Kék színnel jelölve a pozitív kontroll értékei, szürke színnel jelöltem a *Lactobacillus platarum* faj törzseit, melyek nem nőttek fel, így nem értékeltem a kapott abszorbanciákat. Sárgával jelölve a rezisztenciát nem mutató well-ek, zölddel a negatív kontroll értékei)

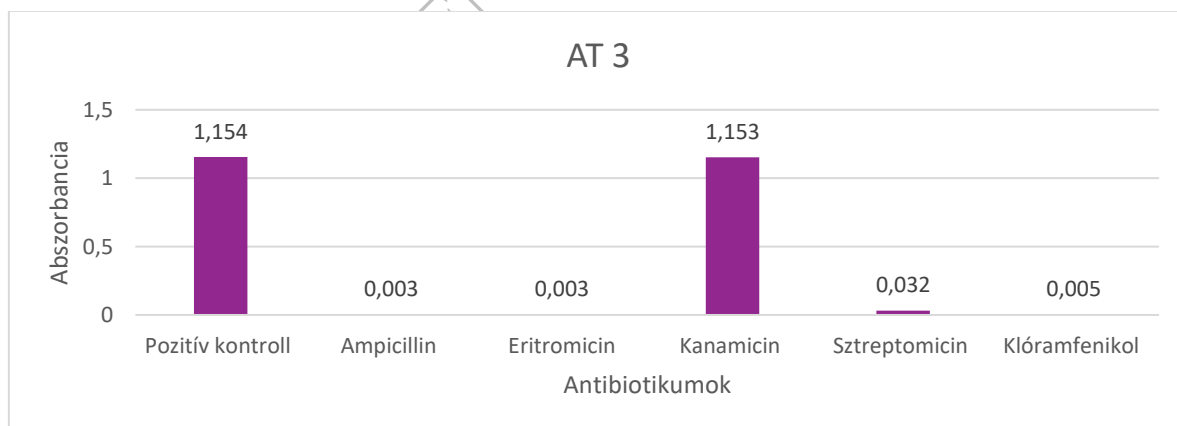
3. mérés	KONTROLL		Ampicillin		Eritromicin		Kanamicin		Sztreptomycin		Klóramfenikol	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,221	0,171	0,132	0,142	0,148	0,151	0,162	0,176	0,162	0,148	0,172	0,173
B	0,192	0,26	0,104	0,098	0,177	0,113	0,269	0,256	0,266	0,302	0,177	0,18
C	1,05	1,181	0,263	0,166	1,081	1,149	1,213	1,169	1,147	1,199	1,024	0,908
D	1,116	1,339	0,334	0,646	1,156	1,149	1,259	1,267	1,211	1,304	1,074	0,966
E	1,117	1,023	0,404	0,586	1,188	0,941	1,249	1,016	1,269	0,995	1,066	0,438
F	1,066	1,235	0,333	0,304	1,165	1,128	1,206	1,225	1,209	1,153	1,05	0,812
G	1,015	1,209	0,303	0,311	1,175	1,176	1,193	1,216	1,204	1,215	0,973	0,863
H	0,803	0,1	0,3	0,085	1,103	0,084	1,147	0,082	1,124	0,081	0,976	0,085

Kék színnel jelöltem a táblázatokban a pozitív kontroll értékeit, illetve zöld színnel jelöltem a negatív kontroll értékeit. Az első két sorban lévő 4 törzs (OR23, OR17, ...) pozitív kontrolljai nem nőttek fel, így ezek antibiotikum jelenlétében mért abszorbancia értékeit nem is tudtam kiértékelni, viszonyítási érték hiányában, ezeket szürke színnel jelöltem a táblázatokban. Narancssárga színnel jelöltem azokat az értékeket, amelyek abszorbancia értéke a negatív kontroll referencia értékéhez közel áll, tehát ezekben a well-ekben az antibiotikum jelenléte mellett a baktériumok növekedése korlátozva volt. A második, illetve harmadik mérés eredményei (9. és 10. táblázat) merőben eltérőek az első mérés (8. táblázat) adataitól, amelynek a mérések között eltelt időkülönbség lehet az oka, mely során a hűtőszekrényben tárolt antibiotikumok veszíthettek a hatékonyságukból. A fél évvel későbbi mérések idejére az eritromicin, sztreptomycin és klóramfenikol aktivitása romlott, melynek köszönhetően a baktériumok ezen antibiotikumok jelenlétében is növekedtek, pedig az első mérés alkalmával a növekedésük még gátolva volt.

Az irodalomban leírtak alapján, az eritromicin 4 °C-os tárolási hőmérsékleten, 8 hét után nem mutatott bomlásra utaló jeleket, azonban szobahőmérsékleten tárolás során már romlott a baktériumölő hatékonysága (Haight és Finland, 1952). A sztreptomicinnel folytatott vizsgálatok megállapították, hogy 10 °C-os hőmérsékleten három hónapon keresztül marad oldat formájában stabil az antibiotikum (Hunt, 1947), azt követően már változik az aktivitása. A baktériumok növekedésének hátterében ez az ok állhat, hiszen a tárolás miatt romlott a hatékonysága az antibiotikumnak. A klóramfenikol érzékeny az UV sugarakra, a romlás oka visszavezethető a fotokatalitikus bomlásra (Chatzitakis et al., 2008), az antibiotikum aktivitásának romlása akár a hosszú tárolási időre, akár a kísérlet során napsugárzásnak kitett tárolásra vezethető vissza. Összességében elmondható, hogy megfelelő tárolási körülmények között is az antibiotikumok egy idő után elvesztik hatékonyságukat, felhasználhatósági idejük véges.

A kiértékelésben ebből az okból kifolyólag a második és harmadik abszorbancia mérés eredményeit nem értékeltem ki, az első mérés eredményeiből vontam le következtetéseket.

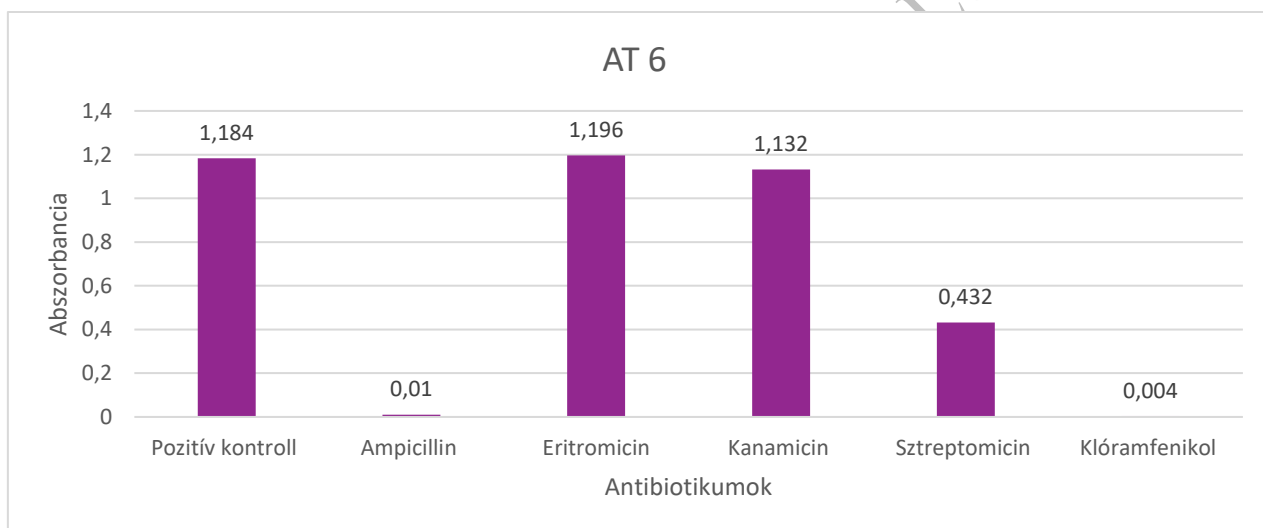
A H8 well-ben lévő negatív kontroll 1,135-ös abszorbancia értéke pipettázási hibára vagy szennyeződésre utalhat. A különböző antibiotikumok hatását az AT 3-as törzs esetében a 4. ábra mutatja be.



4. ábra Az AT 3-as törzs abszorbancia értékeinek átlag és szórás értékei a negatív kontroll 0,1-es értékének korrigálásával, illetve az elő mérés adataiból az eritromicin, sztreptomicin és klóramfenikol eredményei

A pozitív kontrollhoz viszonyítva az AT 3-as törzs eredményei alapján a törzs rezisztenciát mutatott a kanamicinnel szemben, mivel a kanamicint tartalmazó well abszorbancia értéke a pozitív kontroll abszorbanciájával volt azonos, tehát az antibiotikum mellett is szaporodott

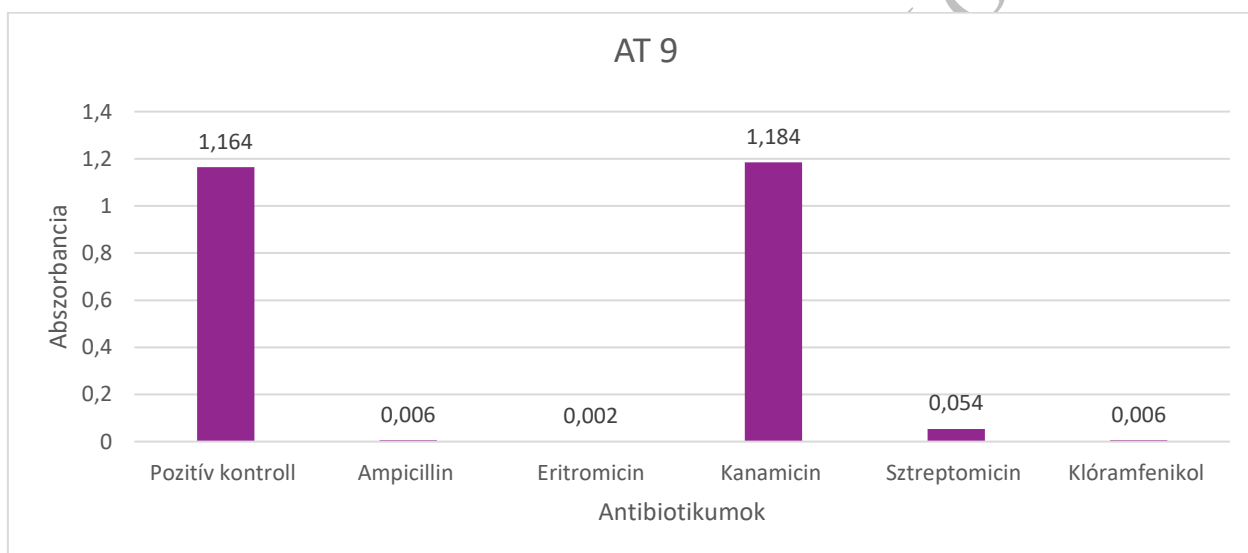
a baktérium. A törzs ampicillin, eritromicin, sztreptomicin és klóramfenikol jelenlétében nem mutatott növekedést. A vizsgálatban résztvevő antibiotikumok negatív kontrollal korrigált értékeihez képest a sztreptomicint tartalmazó well-ben magasabb értéket mértem, mint a további antibiotikumokat tartalmazó well-ek-ben. A korongdiffúziós vizsgálat eredménye alapján a törzs rezisztenciát mutatott ampicillinnel, kanamicinnel, sztreptomicinnel, klóramfenikollal szemben. Az abszorbancia mérés alapján azonban a törzs érzékenyen reagált a klóramfenikolra, illetve az ampicillinre is, mindkét antibiotikum esetében a negatív kontroll értékével közel azonos értékeket mértem, tehát nem növekedett a törzs az antibiotikumok jelenlétében.



5. ábra Az AT 6-os törzs negatív kontrollal korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

Az AT 6-os törzs abszorbancia vizsgálati eredményei alapján a törzs ampicillin, sztreptomicin és klóramfenikol antibiotikumokra mutatta a legalacsonyabb abszorbancia értékeket, ezen antibiotikumok korlátozták a vizsgált tejsavbaktérium törzs növekedését (5. ábra). A sztreptomicin negatív kontrollal korrigált 0,4-es értéke magasabb, mint az ampicillin és klóramfenikolt tartalmazó well-ek-ben mért abszorbancia érték, amelyből azt lehet megállapítani, hogy a törzs sztreptomicin jelenlétében növekedett, azonban gyengébben, mert nem érte el a mért érték a pozitív kontroll értékét. A mérés során a C6 well szabadszemmel jól láthatóan befertőződött, így az itt mért érték nem vehető figyelembe, vagyis az eritromicin esetében mért kiugróan magas, a pozitív kontroll értékét megközelítő érték nem az eritromicinnel szembeni rezisztencia, hanem szennyeződés okozta. Ezt

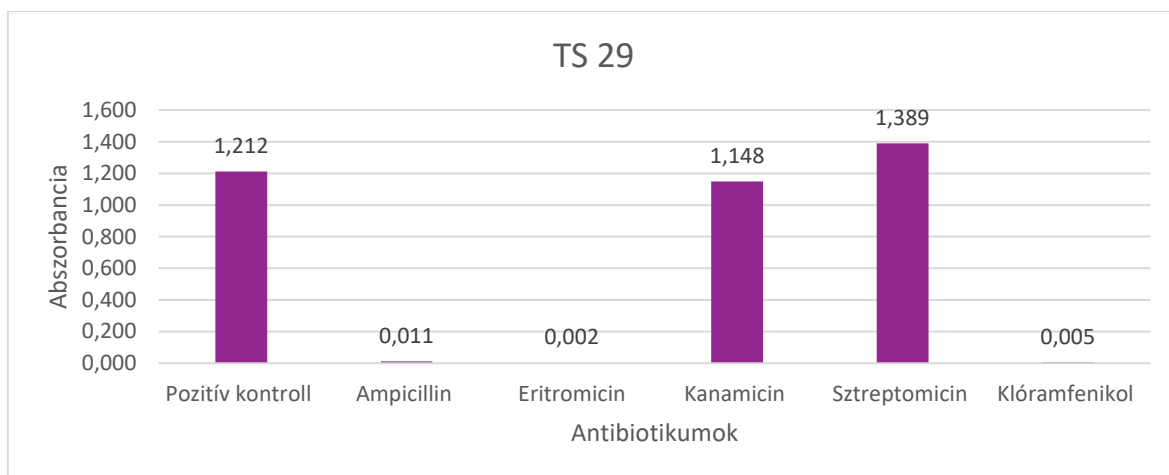
megerősíti, hogy a törzs a korongdiffúziós vizsgálat alkalmával eritromicin jelenlétében gátlási zónát képezett, mely gátlási zóna a további vizsgálatban résztvevő törzsek eritromicinnel mért átmérőjéhez képest az egyik legnagyobb volt. A korongdiffúziós vizsgálat kiértékelése során figyelembe kell venni, hogy szűrőpapírból az agarba szivárgó antibiotikum koncentrációgradiens hoz létre, az így képződő gátlási zóna átmérője minél nagyobb, annál érzékenyebb a vizsgált baktérium az alkalmazott antibiotikumra. A vizsgált törzs kanamicinnel szembeni rezisztenciát mutatott a microplate-es mérés, illetve a korongdiffúziós mérések során egyaránt. A korongdiffúziós vizsgálat eredményei megtévesztőek voltak, az ábrán is jól látható, hogy a klóramfenikol, illetve az ampicillin is megakadályozták a baktérium törzs növekedését.



6. ábra Az AT 9-es törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

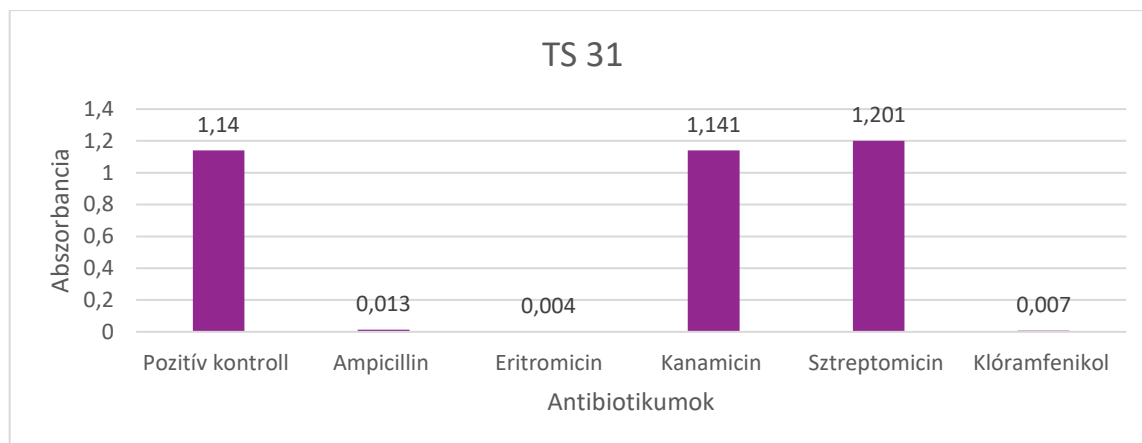
Az AT 9-es törzs ampicillin, eritromicin, sztreptomycin és klóramfenikol antibiotikumok mellett adta a legalacsonyabb abszorbancia értékeket (6. ábra). A sztreptomocint tartalmazó well-ben magasabb, azonban a negatív kontroll értékétől nem szignifikánsan eltérő eredményt kaptam. A sztreptomycin tehát nem ölte el teljes mértékben a baktériumokat, azonban a szaporodásukat korlátozta, érzékenyen reagált az antibiotikumra a törzs. A korong-diffúziós mérések eredményeként azt tapasztaltam, hogy a törzs a vizsgálatban résztvevő antibiotikumok közül egyedül az eritromicinre reagált mérhető feltisztulási zónával. Kanamicin jelenlétében a microplate-es és korong-diffúziós mérések alkalmával egyaránt rezisztenciát mutatott, az antibiotikum jelenlétében növekedés történt a mérések

alkalmával. A korongdiffúziós mérés gátlási zónáinak eredményét is figyelembe véve a *Lactobacillus mucosae* törzsek közül a legnagyobb átmérőjű zónát eritromicin mellett az AT 9-es törzs esetében mértem.



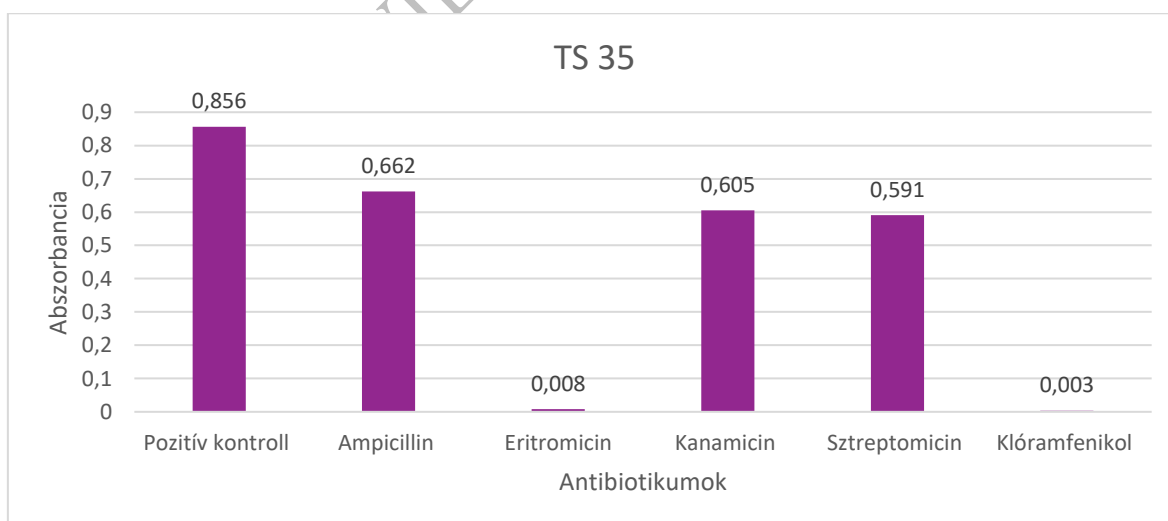
7. ábra A TS 29-es törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

A TS 29-es törzs ampicillin jelenlétében az abszorbancia mérés alkalmával a negatív kontroll értékével szinte megegyező eredményt produkált (7. ábra). A korongdiffúziós mérés eredményei alapján a törzs kizárólag eritromicinre reagált érzékenyen, ampicillin, kanamicin, sztreptomicin és klóramfenikolos oldattal átitatott szűrőkorong körül nem képződött gátlási zóna. A rezisztencia azokkal az antibiotikumokkal szemben, amelyek nem okoztak feltisztulási zónákat nem jelenthető ki, hiszen az abszorbancia mérések során a pozitív kontroll értékeitől alacsonyabb értékeket kaptam eredményül, a tejsavbaktériumok növekedését visszaszorították a kanamicin és a sztreptomicin kivételével az antibiotikumok. Kanamicinnel szemben a microplate-es mérés, illetve a korongdiffúziós mérés alkalmával egyaránt rezisztenciát mutatott a törzs. Sztreptomicinnel szemben az első abszorbancia mérés eredményét alapul véve a pozitív kontroll értékét megközelítő értéket kaptam eredményül, így a korongdiffúziós mérés eredményével összhangban a törzs rezisztenciát mutatott az antibiotikummal szemben.



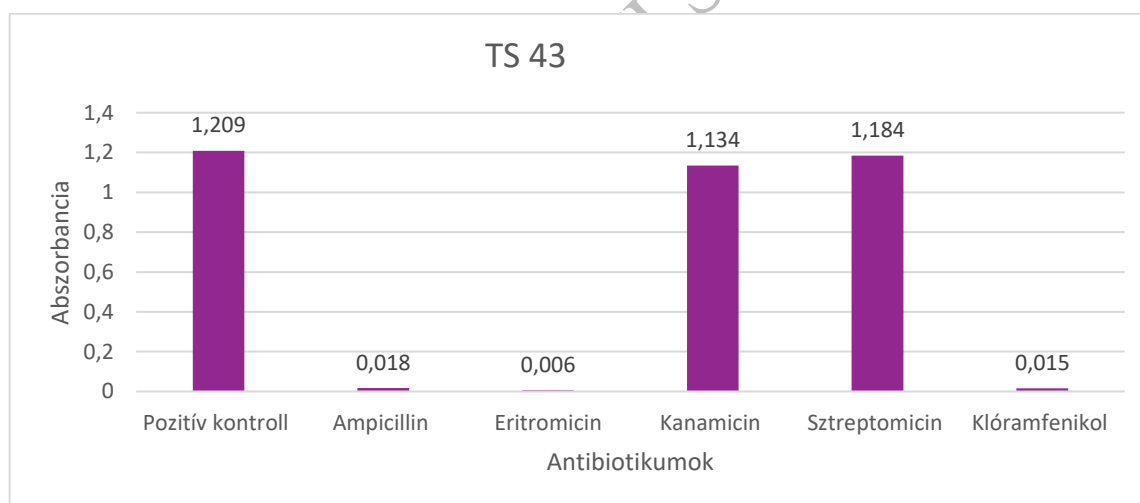
8. ábra A TS 31-es törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

A TS 31-es törzs az abszorbancia mérés eredményei alapján a legalacsonyabb abszorbancia értékeket ampicillin, eritromicin, illetve klóramfenikol jelenlétében mutatott (8. ábra). A törzs a vizsgált *Lactobacillus mucosae* törzsekkel összhangban rezisztenciát mutatott kanamicinnel szemben, továbbá a pozitív kontroll értékéhez közelítő értéket adott sztreptomicin jelenlétében, tehát rezisztensnek mutatkozott a törzs ezzel az antibiotikummal szemben is. A korongdiffúziós vizsgálatok során ampicillin és eritromicin jelenlétében volt mérhető az antibiotikumokkal átitatott szűrőkorongok körül gátlási zóna, a többi, vizsgált antibiotikum nem okozott gátlási zónát, így a rezisztencia a két mérési módszert összevetve a kanamicin és sztreptomicinnel szemben kijelenthető.



9. ábra A TS 35-ös törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

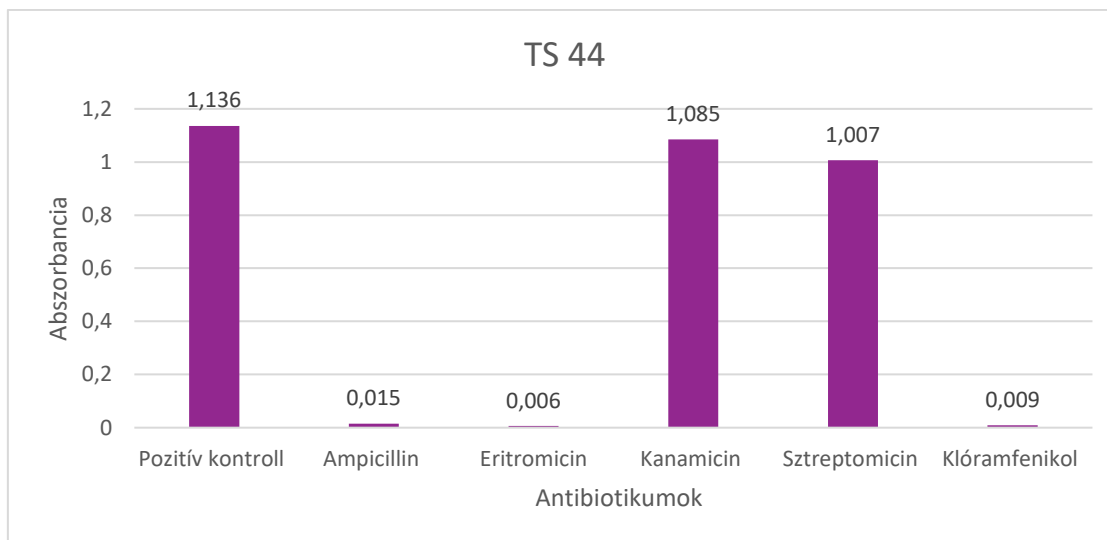
A TS 35-ös törzs az abszorbancia vizsgálat eredményei alapján ampicillin jelenlétében a negatív kontroll értékénél magasabb, azonban a pozitív kontroll 1,0-s értékénél alacsonyabb értéket mutatott, amely arra enged következtetni, hogy az antibiotikum ugyan visszaszorította a törzs szaporodását, azonban nem akadályozta azt meg teljes mértékben (9. ábra). A korongdiffúziós vizsgálatok eredményei alapján a vizsgálatban résztvevő antibiotikumok közül kizárólag az eritromicinnel átitatott szűrőpapír körül volt mérhető feltisztulási zóna, a többi antibiotikumra látszólagos rezisztenciát mutatott a törzs. A kanamicint és sztreptomicint tartalmazó wellek-ben a negatív kontroll értékétől magasabb eredményeket kaptam, a vizsgált törzs azonban nem közelítette meg a pozitív kontroll értéket, tehát ennél a törzsnél a növekedést sikerült csökkenteni az előbb említett antibiotikumok jelenlétében. A TS 35-ös törzs csekély érzékenységet mutatott a faj vizsgált törzseivel szemben azokra az antibiotikumokra is, amelyekre a többi, vizsgálatban résztvevő törzs rezisztenciát mutatott. Kanamicin jelenlétében az abszorbancia vizsgálat során a TS 35-ös törzs volt az egyedüli törzs, amelynek abszorbancia értéke nem közelítette meg a pozitív kontroll értékét.



10. ábra A TS 43-as törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

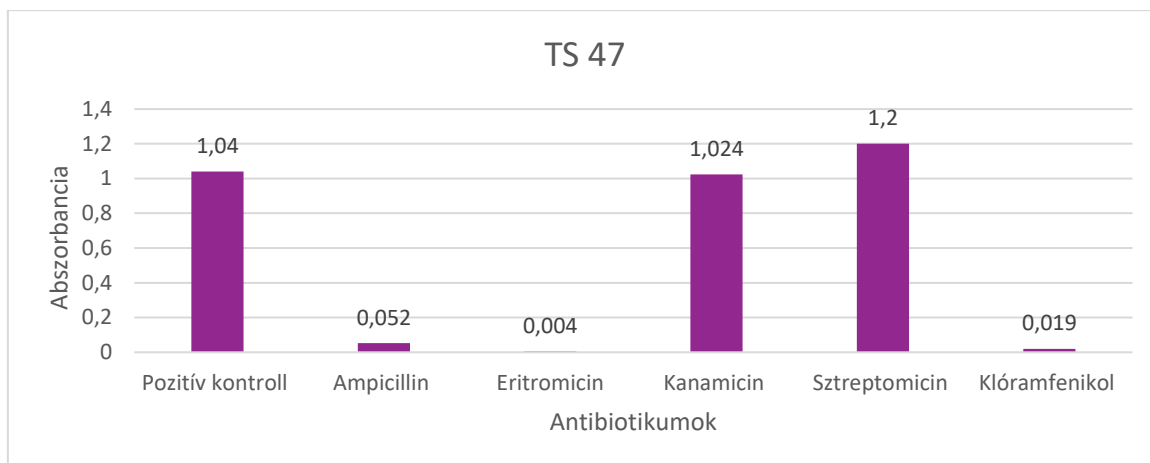
A TS 43-as törzs az abszorbancia vizsgálat eredményei alapján a további vizsgált *Lactobacillus mucosae* törzsekhez hasonlóan kanamicinnel és sztreptomicinnel szemben rezisztenciát mutatott, az abszorbancia értékek alapján a pozitív kontroll referencia értékét megközelítették az ezen antibiotikumokat tartalmazó wellek abszorbancia értékei (10. ábra). A korongdiffúziós vizsgálat alkalmakor eritromicin jelenlétében tapasztaltam mérhető feltisztulási zónát. A törzs tehát a két mérési módszer eredményei alapján kanamicinnel és

sztreptomicinnel szemben mutatott rezisztenciát, a további vizsgált antibiotikumok jelenléte megakadályozta a törzs növekedését.



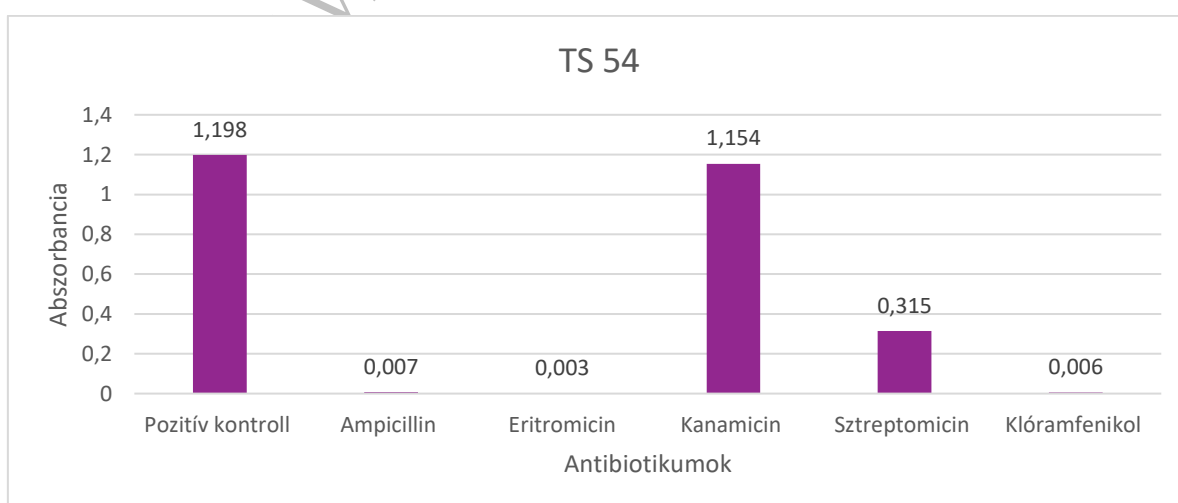
11. ábra A TS 44-es törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

A TS 44-es törzs a korongdiffúziós vizsgálat alkalmával az eritromicinnel átitatott szűrőkorong körül adott mérhető eredményt, kizárólag ennél az antibiotikummal átitatott szűrőkorong körül volt mérhető gátlási zóna (11. ábra). Az abszorbancia vizsgálatok alkalmával a törzs kanamicinnel és sztreptomicinnel szemben mutatott rezisztenciát. A korong diffúziós vizsgálatl szemben áll azonban az ampicillinnel szembeni látszólagos rezisztencia, hiszen az ampicillinnel átitatott szűrőkorong körül nem volt mérhető feltisztulási zóna, azonban az abszorbancia vizsgálatok során láthatóan alacsony, a negatív kontroll értékéhez közeli eredmények születtek. A törzs klóramfenikol jelenlétében alacsony abszorbancia értékeket adott, tehát az antibiotikum megakadályozta a törzs növekedését.



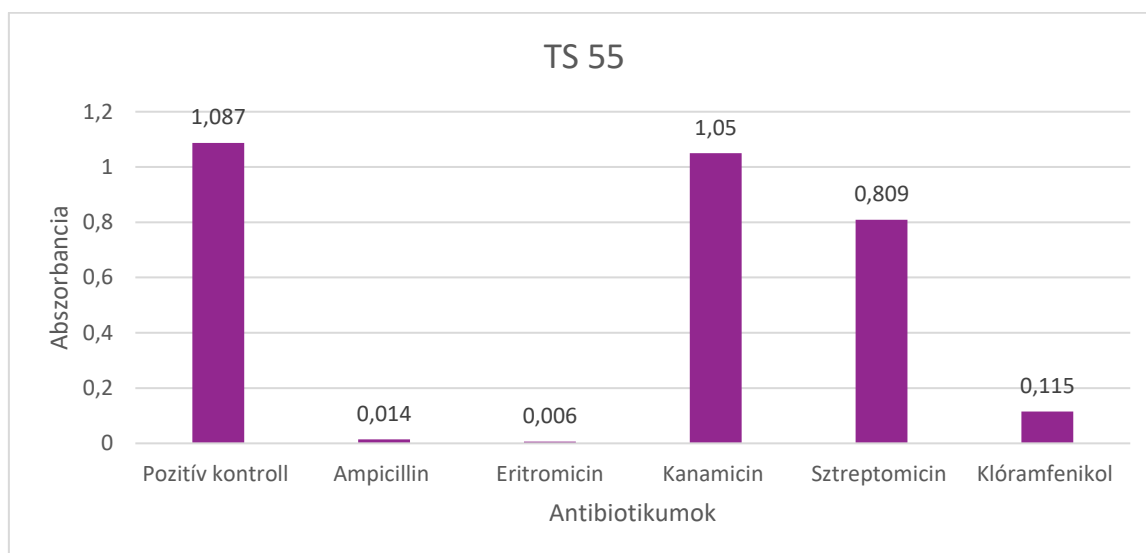
12. ábra A TS 47-es törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

A TS 47-es törzs eritromicin jelenlétében mutatott feltisztulási zónát a korongdiffúziós vizsgálat alkalmával, amely eredménnyel korrelál az abszorbancia vizsgálat eredménye, a törzs növekedését a negatív kontroll értékéhez közeli, 0,004-es értékre sikerült visszaszorítani (12. ábra). Az ampicillin jelenlétében a korongdiffúziós vizsgálat alkalmával ugyan nem tapasztaltam mérhető feltisztulási zónát, az abszorbancia mérések mindegyike során a törzs növekedése a negatív kontroll értékéhez közeli eredményt adott. A törzs kanamicinnel és sztreptomicinnel szemben mutatott rezisztenciát, az abszorbancia vizsgálatok során a pozitív kontroll értékét meghaladták az eredményül kapott abszorbancia értékek, továbbá a korongdiffúziós vizsgálatok eredményei alapján is a rezisztencia ténye jelenthető ki az előbb említett antibiotikumokkal szemben.



13. ábra A TS 54-es törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

A TS 54-es törzs a korongdiffúziós vizsgálat alkalmával befertőződött, így nem kaptam felhasználható eredményt ennek a törzsnek az esetében. Az abszorbancia vizsgálat alapján a törzs növekedését az ampicillin, eritromicin és klóramfenikol antibiotikumok szorították vissza a negatív kontrollból megállapított referencia értékére (13. ábra). A törzs rezisztenciát mutatott kanamicinnel szemben, illetve sztreptomicin mellett ugyan növekedést mutatott, azonban a kapott érték nem közelítette meg a pozitív kontroll értékét.



14. ábra A TS 55-ös törzs negatív kontroll 0,1-es értékével korrigált abszorbancia értékei különböző antibiotikumok jelenlétében

A TS 55-ös törzs a faj további törzseire kapott abszorbancia vizsgálat eredményeivel összhangban kanamicinnel és sztreptomicinnel szemben mutatott rezisztenciát (14. ábra). Ennél a törzsnél kapott abszorbancia érték sztreptomicin jelenlétében kiugróan magas, a pozitív kontroll értékétől csupán két tizeddel tér el. A törzs a faj vizsgálatban résztvevő törzseivel ellentétben nem a negatív kontroll értékénél valamivel magasabb 0,115-ös abszorbancia értéket mértem, így ez a törzs kevésbé érzékenyen reagált a klóramfenikolra. A korongdiffúziós mérés során ampicillin és eritromicin jelenlétében mértem feltisztulási zónát.

A vizsgált törzsek mindegyike rezisztenciát mutatott kanamicinnel szemben. Az AT 6-os, TS 29-es, TS 31-es, TS 35-ös, TS 43-as, TS 44-es, TS 47-es, TS 54-es és TS 55-ös törzsek rezisztenciát mutattak sztreptomicinnel szemben. Sztreptomicin jelenlétében az AT 3-as és AT 9-es törzsek növekedése szorult vissza. A vizsgált *Lactobacillus mucosae* törzsek mindegyike érzékenyen reagált az ampicillin és a klóramfenikol antibiotikumokra. Az eritromicin a korongdiffúziós vizsgálatok mindegyikénél feltisztulási zónát hozott létre az

agar felületére szélesztett baktériumtörzsekkel való kontaktba lépés után. A vizsgált törzsek közül kiemelném a TS 35-ös törzset, amely ampicillin jelenlétében a legmagasabb abszorbancia értéket mutatta, a törzs azonban a kanamicinre érzékenyebben reagált, ennél a törzsnél mértem a legalacsonyabb abszorbancia értéket kanamicin jelenlétében. Az antibiotikumok romlása miatt sajnos a kísérletsorozatomból az első mérés adott kiértékelhető eredményeket, így érdemes lenne a későbbiekben megismételni a mérést friss antibiotikumok felhasználásával is annak érdekében, hogy nagyobb adathalmaz kiértékelésével átfogóbb képet kapjunk arról, hogy a *Lactobacillus mucosae* faj különböző törzseinek kiugró adatai valóban pipettázási hibák vagy keresztszennyezésekből fakadnak, vagy esetlegesen az antibiotikumok romlására vezethetők vissza. A kísérleteim eredményeit az irodalomban leírtakkal összevetve azt tapasztaltam, hogy a faj különböző törzseivel végzett antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során ampicillin, eritromicin, kanamicin, sztreptomicinnel és klóramfenikolra is érzékenyen reagáltak (Royan et al., 2021), amely az általam vizsgált törzsek esetében eltérő eredményeket hozott.

6. Összefoglalás

Az emlősök béltraktusa mikroorganizmusok széles skálájának ad otthont, és ezek a baktériumok részt vesznek a bélrendszerbe kerülő táplálékok megfelelő metabolizmusában. A probiotikumok hozzájárulnak az egészséges emésztéshez, illetve elősegítik az immunrendszer megfelelő működését, fontos szerepet játszanak az egészséges étrend kiegészítésében. A probiotikumok hozzájárulnak a bélflóra egyensúlyának helyreállításához, amely létfontosságú mind az emberek, mind az állatok számára. Az újonnan izolált tejsavbaktérium törzsek probiotikumká való nyilvánítása meglehetősen bonyolult és komplex feladat, melynek egyik alappillére, hogy az adott törzsről megállapítsuk, hogy a baktérium képes-e ellenállni az emésztőrendszer szélsőséges körülményeinek, továbbá vizsgálni szükséges az antibiotikumokra való érzékenységüket, amely potenciális veszélyforrás lehet a rezisztencia gének esetleges átadásának lehetősége miatt. A *Lactobacillus mucosae*, illetve *Lactobacillus plantarum* törzsek antibiotikum rezisztenciájának vizsgálatát két különböző módszer segítségével vizsgáltam, az eredményeket összevettem. A korongdiffúziós vizsgálatok során mindkét tejsavbaktériumfaj törzsei az eritromicinre, illetve ampicillinre reagáltak gátlási zónával, a többi vizsgált antibiotikumra látszólag rezisztenciát mutattak. A vizsgált fajok közül a *Lactobacillus plantarum* faj törzsei az abszorbancia vizsgálat során pozitív kontrollként sem nőttek ki, így ezeknek a törzseknek az abszorbancia értékeit nem értékeltem ki viszonyítási alapot adó kontroll érték hiányában. A vizsgálatom néhány törzs kivételével nagyjából egyöntetű eredményt hozott; a vizsgált törzsek mindegyike kanamicinnel, a törzsek néhány kivétellel pedig sztreptomocinnel szemben is rezisztenciát mutattak. A törzsek növekedése az abszorbancia vizsgálat eredményei alapján ampicillin és eritromicin jelenlétében megállt. Az AT 6-os törzs sztreptomocin jelenlétében nem növekedett az első abszorbancia vizsgálat alkalmával. Mivel a második és harmadik vizsgálat idejére az alkalmazott antibiotikumok egy része bomlásnak indult, ezáltal veszítettek a baktériumölő képességükből, emiatt a fél évvel későbbi vizsgálatok nem relevánsak, így érdemes lenne a törzseket felhasználva megismételni ezt a mérést. A TS 35-ös törzs a vizsgált törzsekkel ellentétben a negatív kontroll értékénél magasabb abszorbancia értéket mutatott ampicillin jelenlétében, azonban kanamicin jelenlétében alacsonyabb abszorbancia értékeket mértem, mint a vizsgált, rezisztens törzsek esetén. Kísérleteim kiértékelése közben azt tapasztaltam, hogy a vizsgált törzsek mindegyike gátlási zónával reagált az eritromicinnel átitatott szűrőpapírkorongra. Az ampicillin esetében a gátlási zónát nem mutató törzsek az abszorbancia vizsgálat során magasabb abszorbancia értékeket mutattak, mint a gátlási zónával rendelkező törzsek. A

vizsgálati eredményeim alapján a vizsgált törzsek közül egyik sem felel meg az EFSA (European Food Safety Authority) által előírt kritériumoknak, melynek oka, hogy a vizsgált törzsek mindegyikénél kanamicinnel szembeni rezisztencia van jelen. A kísérleteket érdemes lenne friss, újonnan vásárolt antibiotikumok felhasználásával megismételni a későbbiekben, annak érdekében, hogy pontosabb eredményeket kapjunk.

HADHÁZI VIVIEN JENNI SZAKDOLGOZAT

7. Irodalmi hivatkozás

- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of medical research*, 36(6), 697-705.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1, 134.
- Antonoplis, A., Zang, X., Wegner, T., Wender, P. A., & Cegelski, L. (2019). Vancomycin–arginine conjugate inhibits growth of carbapenem-resistant *E. coli* and targets cell-wall synthesis. *ACS chemical biology*, 14(9), 2065-2070.
- Arena, M., Fiocco, D., Massa, S., Capozzi, V., Russo, P., & Spano, G. (2014). *Lactobacillus plantarum* as a strategy for an in situ production of vitamin B2. *Journal of Food and Nutritional Disorders*, 1(4), S1-004.
- AT, D., & Action, E. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *Br. J. Nutr*, 81, S1-S27.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., & Zuccotti, G. V. (2011). Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacological research*, 63(5), 366-376.
- Barinov, A., Bolotine, A., Langella, P., Maguin, E., & Van De Guchte, M. (2011). Genomics of the genus *Lactobacillus*. In: Caister Academic Press.
- Blaut, M., Collins, M., Welling, G., Dore, J., Van Loo, J., & De Vos, W. (2002). Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S203-S211.
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *J Gastroenterol*, 44(1), 26-46. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2296-0>
- Brock, T. D. (1961). Chloramphenicol. *Bacteriological Reviews*, 25(1), 32-48.
- Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect*, 44(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*, 28(4), 281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Chatzitakis, A., Berberidou, C., Paspaltsis, I., Kyriakou, G., Sklaviadis, T., & Poulis, I. (2008). Photocatalytic degradation and drug activity reduction of Chloramphenicol. *Water Res*, 42(1-2), 386-394. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.030>

- Chaucheyras-Durand, F., & Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microbes*, 1(1), 3-9. <https://doi.org/10.3920/BM2008.1002>
- Collins, J. W., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., & Searle, L. E. (2009). Application of prebiotics and probiotics in livestock. *Prebiotics and probiotics science and technology*, 1123.
- Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in food science & technology*, 33(2), 93-109.
- DAVIS, B. D. (1988). The lethal action of aminoglycoside. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(1), 1-3.
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Gallo, G., Curci, M., Siragusa, S., Crecchio, C., Parente, E., & Gobbetti, M. (2007). Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *International journal of food microbiology*, 114(1), 69-82.
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhaes Junior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv*, 36(8), 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- de Moraes, G. M. D., de Abreu, L. R., do Egito, A. S., Salles, H. O., da Silva, L. M. F., Nero, L. A., Todorov, S. D., & Dos Santos, K. M. O. (2017). Functional Properties of *Lactobacillus mucosae* Strains Isolated from Brazilian Goat Milk. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 9(3), 235-245. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9244-8>
- Denyer, S. P., Hodges, N. A., & Gorman, S. P. (2008). *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*. John Wiley & Sons.
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res*, 4(2016), 90-101.
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., O'Connell Motherway, M., Shanahan, F., Nally, K., & Dougan, G. (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 2108-2113.
- Feder, H. M., Jr., Osier, C., & Maderazo, E. G. (1981). Chloramphenicol: A review of its use in clinical practice. *Rev Infect Dis*, 3(3), 479-491. <https://doi.org/10.1093/clinids/3.3.479>
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. In. InTech. <https://doi.org/10.5772/47766>
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, 29(8), 388-398.
- Görner, F., & Valik, L. (2004). Aplikovaná mikrobiológia potravín, Malé Centrum. In: Bratislava.
- Gueimonde, M., Sanchez, B., C, G. d. L. R.-G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol*, 4, 202. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>

- Haight, T. H., & Finland, M. (1952). Laboratory and clinical studies on erythromycin. *N Engl J Med*, 247(7), 227-232. <https://doi.org/10.1056/NEJM195208142470701>
- Hasan, T. H., & Al-Harmoosh, R. A. (2020). Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Sys Rev Pharm*, 11(6), 817-823.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition*, 22(1), 283-307.
- Hoover, D. G., & Steenson, L. R. (2014). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press.
- Hunt, G. E. (1947). A Technique for Aeration of Sterile Liquid Culture Medium. *Science*, 105(2720), 184. <https://doi.org/10.1126/science.105.2720.184>
- Ismail, B., & Nampoothiri, K. M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of microbiology*, 192, 1049-1057.
- Jahne, M. A., Rogers, S. W., Ramler, I. P., Holder, E., & Hayes, G. (2015). Hierarchical clustering yields insight into multidrug-resistant bacteria isolated from a cattle feedlot wastewater treatment system. *Environmental monitoring and assessment*, 187(1), 1-15.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Milk, fermentation, and fermented and nonfermented dairy products. *Modern food microbiology*, 149-173.
- Jørgensen, F., Hansen, O., & Stougaard, P. (2004). Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 816-822.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20, 861-875.
- Korhonen, J. (2010). *Antibiotic resistance of lactic acid bacteria*. Itä-Suomen yliopisto.
- Krehbiel, C., Rust, S., Zhang, G., & Gilliland, S. (2003). Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *Journal of Animal Science*, 81(14_suppl_2), E120-E132.
- Mack, D. R., Ahrné, S., Hyde, L., Wei, S., & Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52(6), 827-833.
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., & Hollingsworth, M. A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276(4), G941-G950.

- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L. V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330-339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. *Int J Food Microbiol*, 105(3), 281-295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of food engineering*, 56(2-3), 181-188.
- Mohr, K. I. (2016). History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol*, 398, 237-272. https://doi.org/10.1007/82_2016_499
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Oakey, H. J., Harty, D. W., & Knox, K. W. (1995). Enzyme production by lactobacilli and the potential link with infective endocarditis. *J Appl Bacteriol*, 78(2), 142-148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb02834.x>
- Okano, K., Zhang, Q., Shinkawa, S., Yoshida, S., Tanaka, T., Fukuda, H., & Kondo, A. (2009). Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using a genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and alpha-amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain. *Appl Environ Microbiol*, 75(2), 462-467. <https://doi.org/10.1128/AEM.01514-08>
- Papp-Bata, Á., & Szakály, Z. (2021). A probiotikumok múltja, jelene és jövője. *Tejgazdaság-Hungarian Dairy Journal*, 78(1-2), 19-27.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Medina, M., Vintini, E., & Roux, E. (1999). Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 12(2), 205873929901200207.
- Rafailidis, P. I., Ioannidou, E. N., & Falagas, M. E. (2007). Ampicillin/sulbactam: current status in severe bacterial infections. *Drugs*, 67(13), 1829-1849. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767130-00003>
- Rafailidis, P. I., Ioannidou, E. N., & Falagas, M. E. (2007). Ampicillin/sulbactam: current status in severe bacterial infections. *Drugs*, 67, 1829-1849.
- Rantala, M., & Nurmi, E. (1973). Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B., Venkateshwar, M., & Kumar, E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation—a review. *Biotechnology advances*, 26(1), 22-34.

- Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., & Jonsson, H. (2000). *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50 Pt 1, 251-258. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-251>
- Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology*, 79(1-2), 3-16.
- Rowland, I. R. (1988). Interactions of the gut microflora and the host in toxicology. *Toxicologic pathology*, 16(2), 147-153.
- Royan, M., Seighalani, R., Mortezaei, F., & Pourebrahim, M. (2021). In vitro assessment of safety and functional probiotic properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Iranian native ruminants intestine. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 1187-1200.
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. L., Bories, G., Chesson, A., Coconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., Lopez-Alonso, M., Lopez Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., . . . Galobart, J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J*, 16(3), e05206. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.
- Savadogo, A., Ouattara, A. C., Bassole, H. I., & Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology*, 5(9).
- Sherman, P. M., Johnson-Henry, K. C., Yeung, H. P., Ngo, P. S., Goulet, J., & Tompkins, T. A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7- and enteropathogenic *E. coli* O127: H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and immunity*, 73(8), 5183-5188.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.
- Tannock, G. W. (2003). Probiotics: time for a dose of realism. *Current issues in intestinal microbiology*, 4(2), 33-42.
- Tannock, G. W., & Savage, D. C. (1974). Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infection and immunity*, 9(3), 591-598.
- Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., & Swings, J. (2003). Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 220-226.
- Thomas, C., & Frost, L. (2014). Plasmid Genomes, Introduction to. *Molecular Life Sciences; Springer: New York, NY, USA*, 1-20.

- Todorov, S. D., & Franco, B. D. G. D. M. (2010). Lactobacillus plantarum: Characterization of the species and application in food production. *Food Reviews International*, 26(3), 205-229.
- Walker, W. A. (2008). Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46(Supplement_2), S87-S91.
- Walsh, C. (2003). *Antibiotics: actions, origins, resistance*. American Society for Microbiology (ASM).
- Waters, M., & Tadi, P. (2020). Streptomycin.
- Webber, M. A., & Piddock, L. J. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 51(1), 9-11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>
- Wedajo, B. (2015). Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *J Prob Health*, 3(2).
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *Am J Health Syst Pharm*, 67(6), 449-458. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>

HADHÁZI VIVIEN JENNI SZAKDOLGOZATI

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is hálásan köszönöm a témavezetőimnek, Dr. Kosztik Juditnak és Batáné Dr. Vidács Ildikónak a szakdolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítő munkájukat. Hálásan köszönöm, hogy segítségemre voltak, útmutatásukkal és szakértelmükkel, továbbá a konzultációk során kapott hasznos tanácsaikkal hatalmas segítséget nyújtottak a szakdolgozatom elkészítéséhez.

HADHÁZI VIVIEN JENNI SZAKDOLGOZAT

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Hadházi Vivien Jenni (hallgató Neptun azonosítója: X2FW8X) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

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

Kelt: Budapest, 2023. 05. 02.


Belső konzulens

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Hadházi Vivien Jenni
A Hallgató Neptun kódja: X2FW8X
A dolgozat címe: Tejsavbaktérium törzsek antibiotikum érzékenységeinek vizsgálata
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s 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 tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023.05.03.


Hallgató aláírása

Szerzői nyilatkozat

Alulírott **Hadházi Vivien Jenni**, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet Biomérnök BSc szakos, alkalmazott biotechnológiai modulós hallgatójaként kijelentem, hogy a **Tejsavbaktérium törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata** című szakdolgozat a saját munkám eredménye. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

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

Budapest, 2023.05.03.


a hallgató aláírása