

SZAKDOLGOZAT

Erdős Hajnalka
2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Élelmiszer-
mikrobiológia, -higiénia és –biztonság Tanszék

Különböző közegekkel érintkező műanyag
palackban képződő biofilm kimutatása és
eltávolítása

Erdős Hajnalka

Budapest

2023

Tartalom

1	Bevezetés	1
2	Célkitűzés.....	2
3	Irodalmi áttekintés	3
3.1	Biofilm képződés.....	3
3.2	Biofilm kialakulását befolyásoló tényezők.....	6
3.3	Biofilm eltávolítása.....	7
3.4	Előző kutatási eredmények	9
3.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> rövid jellemzése, előfordulása, kockázata, biofilm képző tulajdonsága	10
3.6	Ivóvíz jellemzése	11
3.6.1	A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> előfordulása ivóvízben	12
3.7	A zöld tea (<i>Camellia sinensis</i>) jellemzői és összetétele	13
3.8	A zöld tea antimikrobás hatása	14
3.8.1	A zöld tea antimikrobás hatása különböző baktériumokra	14
4	Anyagok, módszerek.....	17
4.1	Anyagok.....	17
4.1.1	Biofilm modell elkészítéséhez szükséges anyagok (víz és tea közegben):	17
4.1.2	Palackban megvalósított biofilm vizsgálatához szükséges anyagok:.....	17
4.1.3	Biofilm eltávolítására vonatkozó kísérletekhez szükséges anyagok:.....	17
4.1.4	Felhasznált mikroorganizmusok:	17
4.1.5	Felhasznált tápközegek:	17
4.2	Módszerek	18
4.2.1	Hideg-, és melegvizes eltávolítási módszer modell felületeken.....	18
4.2.2	Hideg-, és melegvizes eltávolítási módszer PET és PP palackok felületéről.....	20
4.2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm képzése teában, modell felületeken	20
4.2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm képzése teában, PET és PP felületen.....	21
5	Kísérleti eredmények és kiértékelésük.....	22
5.1.1	Hideg-, és melegvizes eltávolítási módszer modell felületeken.....	22
5.1.2	Hideg-, és melegvizes eltávolítási módszer PET és PP felületeken.....	23
5.1.3	Tisztítási módszerek hatékonysága	25
5.1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm képzése teában, modell felületeken	26
5.1.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm képzése teában, PET és PP felületen.....	28
5.1.6	Tea-víz összehasonlítás	30
6	Összefoglalás	32

7	Irodalomjegyzék	33
---	-----------------------	----

1 Bevezetés

Az emberi test esszenciális eleme a víz. Nemcsak testünk nagy része áll vízből (60-65%), hanem az alapvető életfunkciók ellátásához is szükségünk van rá. Egy átlagos napon az agyunkon 1400 milliliter, a vesénken pedig 2000 milliliter víz folyik át. A megfelelő vízpótlás miatt az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság a felnőtt lakosság számára napi 2-2,5 liter vízfogyasztást javasol. (Internet 1)

Ha biztosítani szeretnénk az egész napos vízellátásunkat az otthonunktól távol is, akkor szükségünk lehet egy hordozható palackra. Lehet ez az ásványvíz eredeti csomagolása (polietilén-tereftalát), rozsdamentes acél kulacs, esetleg polipropilén anyagból készült palack. Ezeken az anyagokon a vízben található természetes mikroorganizmusok biofilmet képezhetnek. A biofilm képzése a mikroorganizmusok szempontjából előnyös folyamat, mert ebben a formában sokkal ellenállóbbak a környezeti behatásoknak, például a mechanikai hatásoknak, a pH változásnak, az oxigénszegény környezetnek vagy a tápanyaghiánynak. A fogyasztó számára azonban a biofilm képzés egy nemkívánatos jelenség. A víz érzékszervi minőségének befolyásolásán kívül a patogén mikroorganizmusok megbetegedéseket is okozhatnak. A biofilm védelmet jelent a mikroorganizmusok számára, emiatt a sejtek hozzáférhetősége is rosszabb, mint a szabad sejtek esetében. A biofilmek eltávolíthatósága is problémát jelenthet, akár az otthoni környezetben, akár az iparban.

Háztartásainkban a biofilmek eltávolításának leghatékonyabb lehetősége a mosogatás. A mosogatást 18 °C és 65 °C-os vízzel és mosogatószerrel modelleztem laboratóriumi közegben.

2 Célkitűzés

Dolgozatom egy EFOP pályázat keretében kiírt kutatás része, részben Juhász Ivett (2020) és Dancs Vivien (2020) diplomamunkájának folytatása. A kutatás keretében csapvízből és ásványvízből izolált mikrobák a biofilm képződés vizsgálatát végezték, illetve tárolási kísérletet és eltávolítási módszereket vizsgálták műanyag palackokban. Hasonló kísérleteket végeztek a biofilm képzés modell szervezetével, *Pseudomonas aeruginosa*-val is.

Az előző kutatásokra alapozva a kitűzött céljaim:

- A két előző dolgozat alapján, illetve adataikat felhasználva megvizsgálni a biofilm eltávolítás újabb lehetőségeit hideg és meleg vizes kezelésekkel.
- Választ adni arra a kérdésre, hogy az eddig vizsgált kezelések közül melyik hatékonyabb, melyikkel dolgozzunk a háztartásainkban.

Kibővítve az előző munkánkat a kutatásaim során a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm képző képességét cukorral ízesített zöld teában is megvizsgáltam.

Célkitűzésem volt, hogy a tea és a víz között párhuzamot tudjak vonni, megállapítani, hogy melyik anyag szolgál jobb tápközegként a mikroorganizmusok szaporodása és biofilm képzése szempontjából.

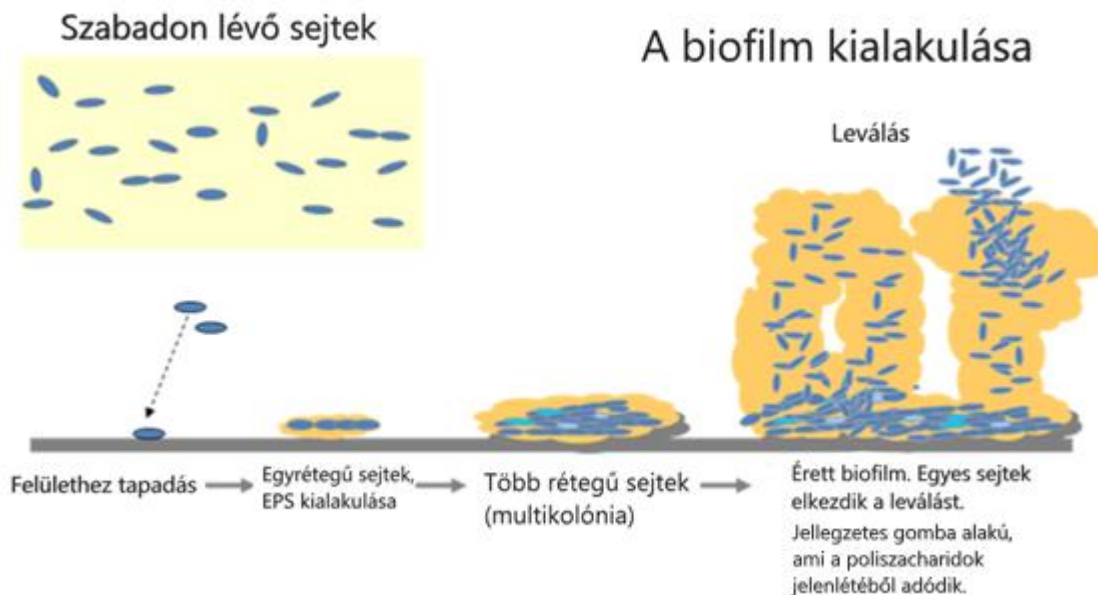
3 Irodalmi áttekintés

3.1 Biofilm képződés

A biofilmekről először 1943-ban Claude E. Zobell tett említést. A biofilm egy vagy több mikroorganizmus által alkotott réteg egy szilárd felszínen. A leggyakoribb példa a biofilm megjelenésére, a dentális plakk. Ezen kívül számos más helyen is előfordul az emberi szervezetben, pl. protézisekben, pacemakerekben, kontaktlencséken, de az emberi testen kívül, például tavakban lévő kavicsok felszínén. A biofilmek sokfélék lehetnek, megjelennek vízben, földön és a föld alatt is, élő és élettelen szöveteken. A biofilm alkotó mikroorganizmusok között is nagy a diverzitás, lehetnek baktériumok, gombák stb.

Egy közös tulajdonság mégis van a biofilmek esetében; nedves felülethez tapadnak (Vidyasagar, 2016).

Az első biofilmek körülbelül 3,25 milliárd évvel ezelőtt jelenhettek meg. Biofilmeket találtak például az ausztráliai Pilbara Craton 3,2 milliárd éves mélytengeri hidrotermális kőzeteiben. Hasonló biofilmek találhatók hidrotermális környezetben, például forró forrásokban és mélytengeri szellőzőnyílásokban (Vidyasagar, 2016).



1. ábra: A biofilm kialakulása (forrás: Vasudevan R., 2014 nyomán)

A biofilm képződésnek Jefferson 2004-es tanulmánya szerint négy oka van:

- Védekezés: a mikroorganizmusok biofilm formában kevésbé érzékenyek a környezetváltozásra.

- Kedvező körülmények: a biofilm segítségével a mikroorganizmusok egy kedvező felülethez tudnak tapadni.
- Közösségi forma: a horizontális génátvitel lehetőségét teremti meg a biofilm formáció.
- Primer életforma számos mikroorganizmus esetében.

A biofilm képződés (1. ábra) akkor kezdődik, amikor a szabadon lebegő mikroorganizmusok, például a baktériumok érintkezésbe kerülnek egy megfelelő felülettel. A kötődésnek ez az első lépése akkor következik be, amikor a mikroorganizmusok ragacsos anyagot termelnek, amelyet extracelluláris poliszacharid (EPS) ismerünk (Jefferson, 2004).

Az EPS mátrix legfőbb feladata, hogy helyet teremtsen, vagyis a mikroorganizmusok az EPS mátrixba tapadnak bele.

Flemming és munkatársai (2007) szerint, ha a biofilm a „mikróbák városa” akkor az extracelluláris poliszacharid a „biofilmsejtek háza”. Az EPS nagyban meghatározza a biofilm életfeltételeit, szabályozza a porozitást, a sűrűséget, a víztartalmat és a töltést is. Szorpciós tulajdonságai révén a biofilmet a felületekhez rögzíti, és tartalék tápanyagként is jelen van. Az EPS több, mint csupán poliszacharid. Cukrokon kívül tartalmaz fehérjéket, glikoproteineket, glikolipideket és extracelluláris DNS-t is. Mivel az EPS-mátrix összetevőit nagyon nehéz elválasztani más makromolekuláktól, ezért a teljes biokémiai profilja még nem ismert.

A kötődést egy növekedési időszak követi. A mikroorganizmusok és az EPS további rétegei épülnek az első rétegekre. Végül soron egy gömbölyű vagy gomba alakú, összetett 3D-s szerkezetet hoznak létre. A vízcsatornák keresztezik a biofilmeket, és lehetővé teszik a tápanyagok és salakanyagok cseréjét.

A növekedési szakaszt követően kialakul az érett biofilm. Végül a biofilmben lévő sejtek elhagyhatják a mátrixot, és új felületen helyezkedhetnek el. Vagy egy sejtcsomó válik le, vagy az egyes sejtek kitörnek a biofilmből, és új felületet keresnek (Jefferson, 2004).

Az, hogy mennyi idő telik el a szakaszok között, illetve, azt, hogy mekkorára képes megnőni egy biofilm, sok minden befolyásolja. Minden biofilm képző mikroorganizmus különböző környezeti paramétereket kedvel, ezáltal a biofilmek nagyságát a környezeti tényezők és a biofilmet alkotó mikroorganizmus fajai erősen befolyásolják. Egy olyan mikroorganizmus, ami nagyobb mennyiségben képes EPS-t termelni, valószínűleg kedvezőtlenebb körülmények között is nagyobb (több rétegből álló) biofilmet képes létrehozni. Ilyen mikroorganizmus pl. a *Pseudomonas aeruginosa*.

A biofilmek előnye tehát, hogy segítik életben tartani a mikroorganizmusokat. Ez azonban nagy hátrány lehet, ha patogén baktériumról van szó.

Hallam és társai (2001) a birminghami egyetemen végzett kutatásukban megállapították, hogy a biofilm képzés nagyban függ a felületek anyagától. Ahogy az 1. táblázat mutatja üveg felületen a legkisebb a mikroorganizmusok aktivitása, a cementen és a nagy sűrűségű polietilénen egy kicsit nagyobb a mikrobák biofilm képző hajlandósága. A legkedvezőbb biofilmképzés céljából azonban a PVC.

1. táblázat: Baktérium aktivitás különböző felületeken (Hallam (2001) nyomán)

Anyag	Aktivitás (pg ATP/cm ²)
Üveg	136
Cement	212
Nagy sűrűségű polietilén	302
PVC	509

A biofilm képződés jelentős problémát jelent az ivóvízipar számára, mint potenciális bakteriális szennyeződés forrása, sok esetben befolyásolja az ivóvíz ízét és szagát, valamint elősegíti a csövek korrózióját.

2016-ban Liu és munkatársai az ivóvízellátó rendszerekben vizsgálták a biofilm kialakulásának tényezőt. A biofilm képzés ezekben a rendszerekben kiemelkedően fontos, mert megvédi a biomassza tömeget a csővezetékben kialakuló nyíróerőtől.

A kutatások azt mutatják, hogy a hőmérséklet-ingadozások nemcsak a baktériumok felülethez való kezdeti kötődését, hanem a biofilmek növekedési sebességét is befolyásolhatják. A *Vibrio cholerae* patogén Gram negatív mikróba (akárcsak a *Pseudomonas aeruginosa*) esetében érettebb biofilmet képez az őszi 12 °C-os hőmérsékleten, mint a nyári 22 °C-ban (Liu és társai 2006).

Gebreyohannes és társai 2019-es kutatásai szerint a biofilm képződést a kommunikáció gátlásával tudjuk megelőzni. A baktériumok quorum sensing segítségével tudnak egymás között információt cserélni. A quorum sensing tulajdonképpen a populációsűrűsége adott ingerválasz. A gének ott fejeződnek ki, ahol a legnagyobb a populáció sűrűsége. Leginkább baktériumokra jellemző és a biofilm képzésének egyik nagy támogatója (a megfelelő környezeti körülmények mellett). Ez a kommunikáció azonban gátolható, természetes úton például a

Delisea pulchra nevű makro vörös alga által termelt halogénezett furanon vegyületek segítségével. Ezek a vegyületek hasonlítanak az acil-homoszerin-laktonokhoz, amiket a Gram negatív baktériumok, mint például a *Pseudomonas aeruginosa* is használ jelzőmolekulaként, ezáltal képesek megzavarni a baktériumok érzékelését. A természetes gátlás mellett használhatunk quorum sensing inhibitorokat is, amelyek hasznosak a kialakulóban lévő biofilm növekedésének gátlásában, illetve a már kialakult biofilm szétszórásában is (Gebreyohannes és társai, 2019). Ilyen quorum sensing inhibitor lehet például a zöld teában is megtalálható polifenol (Yin, 2015).

A *Pseudomonas aeruginosa* esetében kimutatták, hogy az acil-homoszerin laktonok egy ciklikus (L-prolin-L-valin, vagyis két aminosav, a prolin és a valin fúziójából kialakuló) vegyületen keresztül aktiválódnak. Ez a ciklikus vegyület képes bekapcsolni vagy kikapcsolni bizonyos quorum sensing aktivitásokat. Bár ez a mechanizmus még kutatott, az eredmények azt mutatják, hogy a későbbiekben a gátlás hatékony lehet ezzel a módszerrel is.

3.2 Biofilm kialakulását befolyásoló tényezők

A biofilmek úgy alakultak ki, hogy a mikroorganizmusok alkalmazkodnak a környezeti viszonyokhoz. A különböző környezeti paraméterek határozzák meg, hogy a baktériumok biofilmet képeznek vagy sem. A kulcs a környezeti tényezők és a génexpresszió között a hírvivő molekula, például a cAMP. Ezen kívül a bakteriális biofilm kialakításában fontos szerepet játszik a sejt-sejt kommunikáció.

Toyofuku és kutatótársai (2015) azt a megállapítást tették kutatásuk során, hogy a biofilm szerkezete dinamikusan változik a környezeti paraméterek megváltozásával. A *Pseudomonas aeruginosa* oxigén jelenlétében gomba alakú biofilmet képez pálcika alakú sejtekkel. Anoxikus körülmények között háromdimenziós hálós struktúrát hoz létre, amelyik megnyúlt sejtekből épülnek fel. Ez a morfológiai változás egyértelműen megváltoztatja a biofilm diffúziós képességét, illetve az anyagcsere folyamatait.

A kutatók a biofilm hőmérsékletváltozásra adott válaszát is vizsgálták. Kutatásaikból kiderült, hogy a hőmérsékletváltozások drasztikusan befolyásolják a biofilm morfológiáját, beleértve a vastagságot és a sejtsűrűséget. Arra a következtetésre jutottak, hogy az extracelluláris poliszacharid termelés szabályozása is hőmérsékletfüggő folyamat. (Toyofuku és társai, 2015)

Az oxigén és a hőmérséklet változásán kívül egyéb környezeti tényezők is befolyásolják a biofilm kialakulását, például a tápanyagforrás. A tápanyag modellezésére laboratóriumi körülmények között táptalajokat vagy tápleveseket használunk.

Wijesinghe és társai (2019) a *Pseudomonas aeruginosa* és a *Staphylococcus aureus* biofilm alkotó képességét vizsgálták négy különböző táplevesben. Azt a megállapítást tették, hogy mindkét baktérium a Brain Heart Infusion táplevesben szaporodott a legjobban. A kutatók ezt azzal magyarázták, hogy ebben a táplevesben nagyobb mennyiségű pepton, fehérje és só található, amelyek elősegítik a biofilm kialakulását és növekedését. A pepton, a borjúagy és a marhaszív biztosítják a szükséges nitrogénvegyületeket, szénforrásokat, esszenciális növekedési faktorokat, aminosavakat és vitaminokat, amik mind elengedhetetlen komponensek a biofilmek kialakulásához.

3.3 Biofilm eltávolítása

Kiskó és Szabó-Szabó (2011) tanulmányából kiderül, hogy biofilm kialakításában részt vevő sejtek eltérően viselkednek, mint a plaktonikus állapotban lévők, ennek következtében a baktériumok felülethez tapadása akár ezerszeres rezisztenciát eredményezhet az antimikrobás szerekkel szemben. Emiatt a biofilmekhez kapcsolódó baktériumokat jóval nehezebb eltávolítani és elpusztítani, mint a planktonikus (szabadon előforduló) sejteket.

Amennyiben egy patogén mikroba biofilm formában van jelen, az még nagyobb kockázatot jelent, hiszen ebben a formában a legnagyobb az ellenálló képessége. Kiemelten fontos tehát a lehető leghatékonyabb módszerekkel törekedni a biofilmek eltávolítására.

A biofilm sejtek elpusztításához és eltávolításához alkalmazott tisztítási eljárásoknak először fel kell törniük vagy fel kell oldaniuk a biofilmek EPS mátrixát, hogy a fertőtlenítőszerk hozzáférjenek az életképes sejtekhez. Az érett biofilm eltávolítása a legnehezebb feladat, általában valamilyen külön mechanikai beavatkozást igényel a fertőtlenítőn kívül, például súrolást vagy kaparást. Ezt az eljárást nagy körültekintéssel kell végezni, mert egyes kefék és kaparók koptató hatásúak lehetnek, és karcolásokat hagyhatnak a felületeken (elsősorban a rozsdamentes acél felületén), ami elősegíti az ismételt biofilm képződését. (Kiskó és Szabó-Szabó, 2011).

Burfoot és társai 2009-es kísérletükben megállapították, hogy a hideg vizes mosás még fertőtlenítőszer adagolása után se volt olyan effektív, mint a meleg vízzel történő öblítés. A

legjobb módszer a biofilmek eltávolítására, ha a meleg vizes öblítést fertőtlenítőszerrel kombináljuk.

A mikrobák eltávolításának mértéke az alkalmazott tisztítás idejének függvényében nőtt hideg víz használatakor, ezzel szemben ez az összefüggés nem érvényesült meleg vizes tisztítás esetén. A kémiai kezelést követően azonban nem volt szignifikáns különbség a meleg vagy hideg vízzel elért mikrobakoncentráció csökkenés.

A melegvíz a “zöld stratégia” a biofilm eltávolítás esetén, ugyanis nem hagy maga után vegyszermaradványokat, nem okoz korróziót, és a nehezen hozzáférhető helyekre is eljut. Alkalmazása azonban egyes iparágakban, mint a tejipar, nem ajánlott, mert a felülettel érintkező (pl. tej) anyagok fehérjéinek denaturálásával növeli a mikrobák berendezéshez való tapadásának lehetőségét (Kiskó és Szabó-Szabó, 2011).

Kiskó és Szabó-Szabó (2011) azt tapasztalta, hogy a melegvizes kezelés nem bizonyult elegendőnek a *Pseudomonas* biofilmek elpusztításához és eltávolításához. A hő- és mechanikai kezelés vagy vegyszerek kombinációja sikeresebb lehet.

A kutatók azt az eredményt kapták, hogy bár a melegvizes kezelés körülbelül 3 nagyságrenddel csökkentette a *Pseudomonas* biofilmet, maradtak túlélő sejtek, ami lehetővé teszi a biofilm ismételt kialakulását. Ezért a melegvizes kezelés sem tekinthető hatékony eljárásnak az élelmiszeriparban, kivéve, ha további mechanikai vagy kémiai módszerekkel kombinálják.

Peng és munkatársai 2002-ben a *Bacillus cereus* biofilm képző képességét és a fertőtlenítőszerrel történő eltávolítását vizsgálták. Arra a megállapításra jutottak, hogy 24 órás tenyésztés után 10^4 - 10^5 tke/ml baktérium maradt életben, de ezek a baktériumok még nem alkottak biofilmet, szabad állapotban (planktonikus formában) voltak jelen. Biofilm képződését a kutatók a nyolcnapos inkubálás után figyelték meg, rozsdamentes acél felületén, 85 °C-os meleg vizes kezelést követően. A szabad állapotú sejtek esetében 10^6 , a megtapadt sejtek esetében körülbelül 10^5 , az érett biofilm esetében 10^4 baktérium koncentrációt tudtak kimutatni.

2. táblázat: Mikroorganizmusok pusztulása különböző kezelések hatására (forrás: G. Kiskó et al (2011); Y. Fang et al (2010); J. B. Robbins et al (2005))

Mikroorganizmus	Kialakult forma	Közeg	Kezelés	Csökkenés (log TKE/ml)
<i>L. monocytogenes</i>	szabad sejtek	víz	3,5 %-os hidrogén-peroxid (5 perc)	8,7
<i>Ps. aeruginosa</i>	szabad sejtek	víz	melegvizes (85 °C)	6
<i>L. monocytogenes</i>	szabad sejtek	víz	3%-os hidrogén-peroxid	6
<i>L. monocytogenes</i>	szabad sejtek	víz	3,5 %-os hidrogén-peroxid (5 perc)	5,4
<i>B. cereus</i>	szabad sejtek	víz	fertőtlenítőszer	5
<i>Ps. aeruginosa</i>	biofilm (RMA)	víz	melegvizes (85 °C)	4,9
<i>Ps. stutzeri</i>	szabad sejtek	víz	melegvizes (85 °C)	4,5
<i>Ps. stutzeri</i>	biofilm (RMA)	víz	melegvizes (85 °C)	4,2
<i>Ps. aeruginosa</i>	biofilm (RMA)	víz	melegvizes (85 °C)	3,2
<i>Ps. stutzeri</i>	biofilm (RMA)	víz	melegvizes (85 °C)	3,2
<i>E. coli</i>	biofilm (RMA)	víz	nem enzimes fertőtlenítőszer	2,4
<i>L. monocytogenes</i>	biofilm (RMA)	víz	65°C víz	1,4

A 2. táblázat tartalmaz néhány (a szakirodalomban fellelhető) adatot arra vonatkozóan, hogy különböző kezelések hogyan befolyásolták a mikrobák szabadon, illetve biofilmben előforduló sejtjeinek pusztulását.

3.4 Előző kutatási eredmények

Dancs (2020) kísérleteiben a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm képzését és eltávolítási lehetőségeit vizsgálta 6 napos inkubáció során fém és műanyag felületeken. Kutatásai során azt tapasztalta, hogy az inkubáció 2. napján mind a PET, mind a PP modell felületeken 1 nagyságrendnyi koncentráció növekedés volt megfigyelhető. A 6. napra is enyhe csökkenés volt megfigyelhető. Az inkubálás kezdeti szakaszában a megtapadás a rozsdamentes acél lemezekon kevésbé volt intenzív, mint a műanyag felületeken. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a rozsdamentes acél lemezek homogénebb felülete kevésbé biztosít jó tapadási felületet. A felület simasága csak a kezdeti időkben befolyásolta a biofilm képződését, a 6. napra ugyanis tovább nőtt a rozsdamentes acél lemezekon a sejtkoncentráció.

Dancs kutatásaiból az derült ki, hogy a palacköblítés és a súrolás is minden felületen 90%-os hatékonyság felett volt. A palacköblítéssel a palack belső felületén maradt baktériumok 90-100% eltávolította, de nem volt elegendő az összes maradék sejtszám kimutatására.

3.5 *Pseudomonas aeruginosa* rövid jellemzése, előfordulása, kockázata, biofilm képző tulajdonsága



2. ábra: *Pseudomonas aeruginosa* illusztráció (forrás: Christoph Burgstedt/Science Photo Library)

A *Pseudomonas aeruginosa* egy a természetben mindenütt előforduló, Gram negatív, biofilm képző baktérium. Kizárólag aerob légzéssel képes energiát termelni. Opportunista kórokozó, a legyengült szervezetet támadja. Képes megfertőzni a növényeket, az állatokat és az embert is. Az emberben általában tüdőgyulladást és húgyúti fertőzéseket okozhat. Mivel jó a biofilm kialakító képessége, ezért nemcsak élő, hanem élettelen felülethez is tud tapadni, ami elősegíti a pszeudomonális fertőzések megjelenését a test bármely részén. Ezen túlmenően a biofilm erős védelemet biztosít a sejteknek, melynek következtében a *Pseudomonas aeruginosa* a legtöbb antimikrobás szerre rezisztens (Sharma, 2014).

Matteo és társai 2018-ban kutatásaik során megállapították, hogy ez a baktérium évente összesen 51 000 egészségügyi fertőzést okoz az USA-ban.

Bár Magyarországra vonatkozóan ilyen kutatás nem készült, a Nemzeti Népegészségügyi Központ vizsgálta a sebfertőzések kórokozóinak megoszlását. (3. táblázat)

3. táblázat: Sebfertőzések kórokozóinak megoszlása Magyarországon (forrás: Nemzeti Népegészségügyi Központ nyomán, Internet 2)

Kórokozók	A sebfertőzések során izolált kórokozók megoszlása (%)
<i>Enterococcus spp.</i>	26,0
<i>Escherichia coli</i>	22,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,4
<i>Klebsiella spp.</i>	6,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6
<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	6,0
<i>Proteus spp.</i>	4,0
<i>Enterobacter spp.</i>	4,0
<i>Acinetobacter spp.</i>	2,4
<i>Candida spp.</i>	2,4
<i>Clostridium spp.</i>	2,4

A táblázatból látható, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* a sebfertőzések 5,6%-ban fordult elő.

3.6 Ivóvíz jellemzése

„A víz akkor felel meg az ivóvíz minőségnek, ha nem tartalmaz olyan mennyiségben vagy koncentrációban mikroorganizmust, parazitát, kémiai vagy fizikai anyagot, amely az emberi egészségre veszélyt jelenthet” – mondja ki az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről szóló 201/2001. (X. 25.) Kormányrendelet (Internet 3).

A kormányrendelet jogszabályban határozza meg a mikroorganizmusok határértékét az ivóvízben. (4. táblázat)

4. táblázat: Tartályban forgalmazott vízre vonatkozó határértékek (forrás: Vízművek nyomán)

Vízminőségi jellemző	Határérték
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	0/250 ml
<i>Enterococcusok</i>	0/250 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250 ml
Telepszám 22 °C-on	100/ml
Telepszám 37 °C-on	20/ml

Az általunk ismert élet víz nélkül nem fejlődhetett volna ki. Felnőtt férfiaknál 3,7 liter, felnőtt nőknél 2,7 liter napi vízbevitel kielégíti az emberek túlnyomó többségének szükségleteit. (Sawka, 2005). A napi vízszükséglet széles skálán mozog, függ a kortól, nemtől, testtölegetől, fizikai aktivitás mértékétől stb. A víz azért fontos az emberi szervezet számára, mert;

- a víz szállítja a véráramban a fontos tápanyagokat
- segíti a salakanyagok eltávolítását

- nyálat képez
- megvédi az ízületeket
- az agy-gerincvelői folyadék nagy része víz (Internet 4)

A víz minősége gyakran összefügg a bakteriális szennyezettség mértékével. A 201/2001. (X. 25.) Kormányrendelet két típusú szennyezést különböztet meg; a kémiai és a mikrobiológiai szennyező anyagokat.

5. táblázat: Az ivóvízre jellemző mikrobiológiai határértékek (forrás: Vízművek nyomán)

Vízminőségi jellemző	Határérték (szám/100 ml)
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	0
<i>Enterococcusok</i>	0

6. táblázat: Az ivóvíz kémiai minőségjelző határértékei (forrás: Internet 5)

Ivóvízminőségi paraméter	Határérték
Összes keménység (nk°)	5-35
pH	6,5-9,5
Fajlagos elektromos vezetőképesség (mS/cm)	2500
Kémiai oxigénigény (mg/l O ₂)	5
Nátriumkoncentráció (mg/l)	200
Káliumkoncentráció (mg/l)	-
Magnéziumkoncentráció (mg/l)	-
Arzénkoncentráció (µg/l)	10
Ammóniumkoncentráció (mg/l)	0,5
Nitrátkoncentráció (mg/l)	50
Nitritkoncentráció (mg/l)	0,5
Kloridkoncentráció (mg/l)	250
Szulfátkoncentráció (mg/l)	250
Vaskoncentráció (µg/l)	200
Mangánkoncentráció (µg/l)	50
Alumíniumkoncentráció (mg/l)	0,2
Fluoridkoncentráció (mg/l)	1,5

A legmagasabb határértéket a nátrium-, a legalacsonyabb értéket pedig az alumíniumkoncentrációra határozták meg. Magyarországon (jellemzően az alföldi településeken) leginkább az arzénkoncentráció változását monitorozzák.

3.6.1 A *Pseudomonas aeruginosa* előfordulása ivóvízben

A *Pseudomonas aeruginosa* mennyisége a biofilm szennyezettséget jelző paraméter a vízhálózatokban. A megengedett határértéke 0 telepképző egység/100 ml. (Nemzeti Népegészségügyi Központ, 2021)

A talajban és a vízben általában alacsony számban fordul elő, de a 20°C-nál magasabb hőmérséklet és a pangó vizek kedvező körülményeket biztosítanak az elszaporodásukhoz. A probléma az, hogy akár a vízhálózatban használt elemek (pl. aktív szén szűrő) is lehetnek szennyezőforrások, mert a baktériumok meg tudnak telepedni rajtuk és biofilmet képezni, ami növeli a tűrőképességüket, ezáltal hosszútávon is életképesek maradnak, a hővel való sterilizálásnak is ellenállnak. Emellett nem szabad elfelejtenünk az otthonainkban használt vízszűrő berendezésekről, pl. vízszűrő kancsókról sem, amik szintén kiváló búvóhelyei a biofilmet alkotó mikroorganizmusoknak. (Internet 6)

Vargha Márta, a Nemzeti Népegészségügyi Központ vízhygiénáért felelős vezető főtanácsosa szerint „Az irreális elvárás, hogy a víz egyáltalán ne tartalmazzon olyan anyagokat, amelyek nagy koncentrációban szennyeződésnek minősülnek.” A *Pseudomonas aeruginosa* határtáértéke 100 ml vízre vonatkoztatva nulla, de ha a víztérfogatot megnöveljük, előfordulhat, hogy *Pseudomonas aeruginosa* is detektálható lesz, ez azonban elhanyagolható kockázat. Az ivóvízre is vonatkozik egy úgynevezett „társadalmilag elfogadható kockázati szint”, ami a fejlett országokban 10^{-6} , vagyis egymillióból egy fertőzést jelent. (Internet 7)

3.7 A zöld tea (*Camellia sinensis*) jellemzői és összetétele

Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet szerint a tea a második leg többet fogyasztott ital a világon, a víz után. (Internet 8)

A gyógynövények kivételével minden teatípust a *Camellia sinensis* bokor szárított leveleiből főznek. A zöld tea az egyik legkevésbé feldolgozott teafajta, emiatt benne van a legtöbb antioxidáns és jótékony polifenol. (Warwick és Ware, 2021)



3. ábra: *Camellia sinensis* (forrás: Science Photo Library)

3.8 A zöld tea antimikróbás hatása

A zöld tea antibakteriális hatással rendelkezik, amely a zöld tea polifenol tartalmából fakad. A polifenolok közül a katechinek emelkednek ki, ugyanis a leghatékonyabban károsítják a baktériumsejt membránját, gátolják az enzimaktivitást. A katechinek a sejtmembrán károsítása miatt a biofilm képzést is ellehetetlenítik (Reygaert, 2014). Ugyanakkor a tea katechinek kevésbé hatnak a Gram-negatív sejtfallú baktériumokra, hiszen a külső membránjukban megtalálható lipopoliszacharid molekulák elnálló gátat képeznek a külvilág elől érkező anyagoknak. (Reygaert, 2014). A Gram-negatív baktériumok külső foszfolipid membránja számos környezeti anyaggal szemben gátat képez, beleértve az antibiotikumokat is (Arora és társai, 2009).

3.8.1 A zöld tea antimikróbás hatása különböző baktériumokra

Toda és kutatótársai 1989-ben megállapították, hogy a tea gátló hatást fejt ki, vagy teljesen el is pusztítja a következő mikroorganizmusokat; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* és *Vibrio spp.*, köztük a *Vibrio cholerae*.

2009-ben Arora és kutatótársai a mindennapi teafogyasztást próbálták modellezni, az antibakteriális hatás mérése közben. Megállapították, hogy az érzékenység mérsékelten nő a koncentráció növelésével (ebben az esetben a zöld tea filterek áztatási ideje adja meg a tea koncentrációt).

7. táblázat: A baktériumok érzékenységének összehasonlítása (mm-ben) tea és kávé vizes kivonatára és készítményeikre (Arora (2009) nyomán)

Baktérium	Fekete tea kivonat	Fekete tea preparátum	Zöld tea kivonat	Zöld tea preparátum	Kávé kivonat	Kávé preparátum
<i>Ent. faecalis</i>	-	-	-	-	22,5	23,6
<i>Ps. aeruginosa</i>	17	15	18	15,5	20,4	21,4
<i>Salm. typhi</i>	16,5	15	16,9	15,7	-	-
<i>Sh. flexneri</i>	19	18	19,5	18	21,3	22
<i>Staph. aureus</i>	20	17	23	19	16,3	16,8
<i>Staph. epidermidis</i>	25	23	27,5	25	19,6	20
Átlag	16,2	14,6	17,5	15,5	16,7	17,3
Szórás	8,52	7,76	9,39	8,35	8,44	8,78

8. táblázat: A baktériumok érzékenységének összehasonlítása (mm-ben) standard antibiotikumokra (Arora (2009) nyomán)

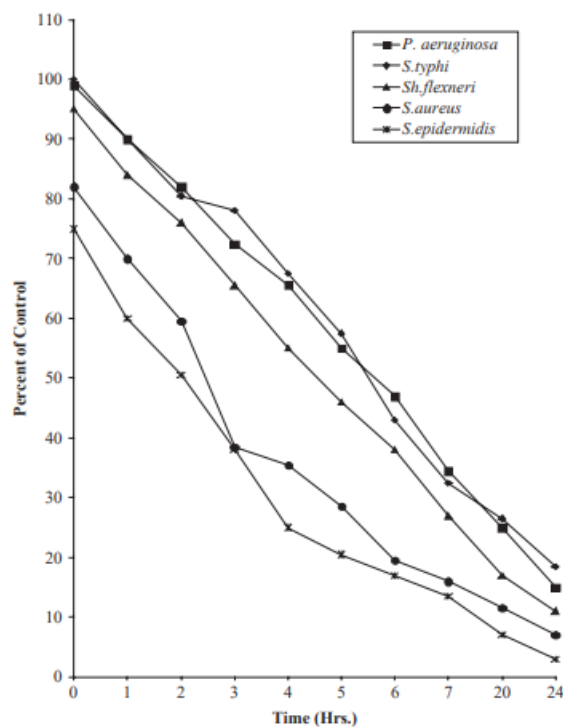
Baktérium	Ampicillin	Klóramfenikol	Co-trimoxazol	Tobramicin
<i>Ent. faecalis</i>	21	23	-	9
<i>Ps. aeruginosa</i>	-	16	-	19
<i>Salm. typhi</i>	10	19	16	13
<i>Sh. flexneri</i>	23	25	18	17
<i>Staph. aureus</i>	30	22	21	18
<i>Staph. epidermidis</i>	26	20	-	17
Átlag	18,3	20,8	9,16	15,5
Szórás	11,22	3,19	10,16	3,78

A 7. és a 8. táblázatban korong diffúziós módszerrel hasonlították össze a baktériumok érzékenységét standard antibiotikumok és a tea és kávé kivonatok és vizes készítményeinek (5%-os koncentrációban) alkalmazásával. A mm-ben megadott értékek a gátlási zóna átmérőjét jelentik. Látható, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* esetében a legjobb baktériumölő hatása a standard antibiotikumnak volt (tobramicin, 19mm), de a zöld tea (18mm) és a fekete tea (17mm) kivonat is gátló hatást fejtett ki. A klóramfenikol, mint standard antibiotikum (16mm) és az 5%-os zöld- illetve fekete tea (15,5mm és 15mm) preparátum gátló hatása kisebb mértékű volt az előzőekéhez képest.

Lényegében az antibiotikumok és a természetes antibakteriális szerek között (tea és kávé) nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés. Az extraktum és a preparátum közötti különbséget a feldolgozás módja (mechanikai) és az erjesztés adhatja.

Ez a tanulmány volt segítségemre, amikor kiválasztottam a zöld teát, mint a potenciálisan legjobb baktériumölő képességű közeget.

A fenti táblázatból is kiderül, hogy csak néhány antibiotikum képes a *Pseudomonas aeruginosa* gátlására, tehát a legnagyobb probléma ezen baktérium esetében az antibiotikum rezisztencia. Sajnos nagyon kevés antipseudomonális ágens létezik, amely megbízhatóan gátolja a *Pseudomonas aeruginosa* aktivitását.



4. ábra: 5%-os vizes zöldtea kivonat hatása különböző baktériumokra (forrás: Arora, 2009)

A 4. ábrán figyelhető meg 5%-os tea extraktum különböző baktériumfajokra kifejtett gátló hatása. A legtöbb baktérium esetében huszonnég órák kezelés után sem volt 100%-os gátlás Arora és munkatársai vizsgálatai alapján (2009). Más tanulmányokban (Toda, 1989, Mahajan, 1991 és Shetty 1994) azonban a magas, 20-25%-os koncentráció körülbelül 3-4 órán belül 100%-os pusztulást eredményezett. Ez utóbbi, nagy koncentráció azonban nem modellezi a mindennapi teafogyasztást. (Arora, 2009)

A tanulmány legfontosabb megállapítása a teához adott cukor és tej befolyásoló hatásának vizsgálatával kapcsolatos. A cukor és a tejfehérjék bizonyos mértékben komplexet képeznek a tea polifenoljaival, de emiatt csak jelentéktelen mértékben csökkenhet a mikrobagátló hatás. Arora és társai mellett, Reddy és társai (2005) is arra a megállapításra jutottak, hogy a teához adott tej nem befolyásolja a tea antimikrobás hatását.

Egy másik tanulmányban a cukor, mint potenciális befolyásoló tényező hatását vizsgálták. Kwang Y. Kim és J. Frank (1995) a *Listeria monocytogenes* vizsgálata során megállapították, hogy a mikroorganizmus növekedését rozsdamentes acélon az 1-20 g/l közötti glükóz koncentráció nem befolyásolta. A kutatók öt különböző szénhidrátot vizsgáltak meg és megállapították, hogy csak a mannóz és a trehalóz fokozta a biofilm fejlődését.

4 Anyagok, módszerek

4.1 Anyagok

4.1.1 Biofilm modell elkészítéséhez szükséges anyagok (víz és tea közegben):

- Polipropilén lemez (4 mm vastag és 74 mm hosszú x 24mm széles)
- Rozsdamentes acél lemez (0,3 mm vastag és 75 mm hosszú x 24 mm széles)
- Polietilén teraftalát lemez (0,1 mm vastag és 75 mm hosszú x 24 mm széles)

A polipropilén és a rozsdamentes acél autoklávozható, a PET lemezeket pedig 70%-os alkoholba mártva tettem mikróba mentessé.

4.1.2 Palackban megvalósított biofilm vizsgálatához szükséges anyagok:

- Kereskedelemben kapható szénsavmentes ásványvíz palackok (0,5 liter)
- Kereskedelemben kapható polipropilén anyagú kulacs
- 70%-os alkohol
- steril csapvíz
- filteres zöld tea (Naturland)
- cukor

4.1.3 Biofilm eltávolítására vonatkozó kísérletekhez szükséges anyagok:

- Kereskedelemben kapható mosogatószer
- steril csapvíz; hideg víz (18°C), meleg víz (60°C)

4.1.4 Felhasznált mikroorganizmusok:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027

4.1.5 Felhasznált tápközegek:

Tripton Glükóz Élesztőkivonat – TGE általános táptalaj:

5 g	Pepton
2,5 g	Élesztőkivonat
1 g	Glükóz
15 g	Agar
1000 ml	Desztillált víz

9 ml-es hígító folyadék:

1 g	Pepton
8,5 g	Nátrium-klorid
1000 ml	Desztillált víz

R2A tápleves:

0,5 g	Élesztőkivonat
0,5 g	Pepton
0,5 g	Kazeinsav hidrolizátum
0,5 g	Dextróz
0,5g	Keményítő
0,3 g	Dikálium-foszfát
0,049g	Magnézium-szulfát
0,3 g	Nátrium-piruvát
1000 ml	Desztillált víz

TSA általános táptalaj:

30 g	TSB
15 g	Agar
1000 ml	Desztillált víz

A tápközegeket és vizeket bemérést, illetve a hígító folyadékok esetében adagolást követően autoklávozással (121 °C-on, 15 percig) steriliztem.

4.2 Módszerek

4.2.1 Hideg-, és melegvizes eltávolítási módszer modell felületeken

A *Pseudomonas aeruginosa* biofilm képzését három felületen vizsgáltam meg, rozsdamentes acélon, polipropilénen és polietilén-tereftaláton. A lemezek mérete 74 × 24 mm.

- 1) A PET lemezeket 70%-os alkoholba merítettem, a PP és rozsdamentes acél lemezeket autoklávban csíramentesítettem.

- 2) A *Pseudomonas aeruginosa* tenyészetből TSA ferde agarra átoltottam, majd egy napig 30 °C-on inkubáltam, így a kísérletekhez egy 24 órás friss tenyészetet használhattam.
- 3) A friss tenyészetből szuszpenziót készítettem, melynek koncentrációját optikai denzitásmérő segítségével 10^8 sejt/ml-re állítottam be (DEN-1B McFarland Densitometer, Biosan).
- 4) Az elkészített szuszpenzióból 1 ml-t pipettáztam 100 ml R2A tápleveshez.
- 5) A *Pseudomonas aeruginosa*-val beoltott táplevesbe helyeztem a steril lemezeket, majd egy óráig 30°C-on inkubáltam. Ezalatt az idő alatt a sejtek egy része irreverzibilisen megtapadt a felületen.
- 6) A lemezek egyharmad részét elkülönítettem a 0. napos mintavétel céljából. Az inkubálási idő leteltével a kontroll lemezeket 5-5 ml steril vízzel öblítettem le, hogy a reverzibilisen felülethez tapadt sejteket eltávolítsam.
- 7) A lemezek kétharmad részét steril vízzel történő öblítést (5-5 ml oldalanként) követően újabb, csak steril R2A táplevest tartalmazó Petri csészékbe helyeztem át további inkubálás (30°C, 2 illetve 6 nap) céljából.
- 8) A 2 illetve 6 napos inkubálási idő lejártá után a hideg vizes kezelés során a lemezeket 5 ml steril vízzel történő öblítés után további 10 ml hideg, 18 °C-os steril vízzel öblítettem le.
- 9) A meleg vizes kezelés során a lemezeket a kontroll kezelésen kívül 10 ml meleg, 60 °C-os steril vízzel öblítettem le.
- 10) A tamponos mintavétel során a lemezek felületét külön-külön benedvesített, steril mintavevő tamponnal átdörzsöltem, majd hígítóba mostam a tampont.
- 11) Szükség szerint hígítási sort készítettem.
- 12) A sejtszám meghatározásához lemezöntést végeztem; lemezöntés során 1 ml-t pipettáztam a mintákból, majd TGE tápagart öntöttem a Petri csészékbe, homogenizáltam, majd 30 °C-on két napig inkubáltam.
- 13) A tamponos mintavétel mellett a lemezeket epifluoreszcens mikroszkóp alatt is megvizsgáltam (OLYMPUS BX41). A lemezeket a kontroll illetve a tisztítási kezelések után akridinnarancs festékkel festettem meg (0,02 g/ 100 ml víz), amit 2 percig állni hagytam, majd leöblítettem. Ezt követően 100-szoros nagyítású objektívvel, homogén immerziós vizsgálatot végeztem.

4.2.2 Hideg-, és melegvizes eltávolítási módszer PET és PP palackok felületéről

- 1) A palackokat csíramentesítettem: a PP palackokat csapvízzel feltöltve autoklávoztam, a PET palackok belsejét pedig 30 ml 70%-os alkohollal öblítettem át, és hagytam az alkoholt elpárologni.
- 2) 24 órás *Pseudomonas aeruginosa* tiszta tenyészetből kiindulva szuszpenziót készítettem. 10^8 sejt/ml-es koncentrációt állítottam be az optikai denzitásmérő segítségével. (DEN-1B McFarland Densitometer, Biosan).
- 3) A steril palackokba fél liter steril vizet töltöttem, amibe 0,5 ml 10^5 koncentrációjú hígított szuszpenziót pipettáztam.
- 4) A 0. napon három kontroll palack vizéből egy óra inkubáció után 1 ml mintát vettem, amiből lemezöntéssel (TGE agar, inkubálás hőmérséklete 30°C) mutattam ki a víz kezdeti mikrobaszámát.
- 5) A tárolás során a különböző tisztítási eljárások modellezéséhez három palack szolgált kontrollként, három palackkal hideg vizes, további 3 palackkal meleg vizes öblítést végeztem. A kontroll esetén a palackban 2 illetve 6 napig tárolt vizet kiöntöttem. A hideg és meleg vizes öblítések hatásának vizsgálatához a kezeléseknek megfelelő hőmérsékletű (18°C/60°C) 100 ml mosogatószeres steril vízzel öblítettem át a palackokat, majd 100 ml tiszta, steril öblítővízzel távolítottam el a mosogatószermaradványokat, illetve a reverzibilisen a felületre tapadt baktériumokat.
- 6) A palackok teljes belső felületéről tamponos módszerrel mintát vettem (a PET palackok esetében forró szikével kettévágtam a palackot, hogy a tamponnal hozzáférjek minden részéhez.).
- 7) A mintavételt követően szükség szerint hígítást végeztem, majd TGE agarral történő lemezöntéssel mutattam ki a mikrobákat.
- 8) A lemezeket 30°C-on, 2 napig inkubáltam.

4.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm képzése teában, modell felületeken

- 1) A PP lemezeket autoklávban csíramentesítettem, a PET lemezeket pedig 70%-os alkohol segítségével tettem mikróba mentessé.
- 2) Filteres zöld teát használva teát főztem, fél liter vízben egy filtert áztattam 5 percig. 10 g cukrot adtam minden fél literes palackhoz (20 g/l cukorkoncentrációval dolgoztam).
- 3) Szuszpenziót készítettem *Pseudomonas aeruginosa* 24 órás friss tenyészetből, melynek koncentrációját optikai denzitásmérő segítségével 10^8 sejt/ml-re állítottam be
- 4) Az elkészített szuszpenzióból 1 ml-t pipettáztam 100 ml steril zöld teához.

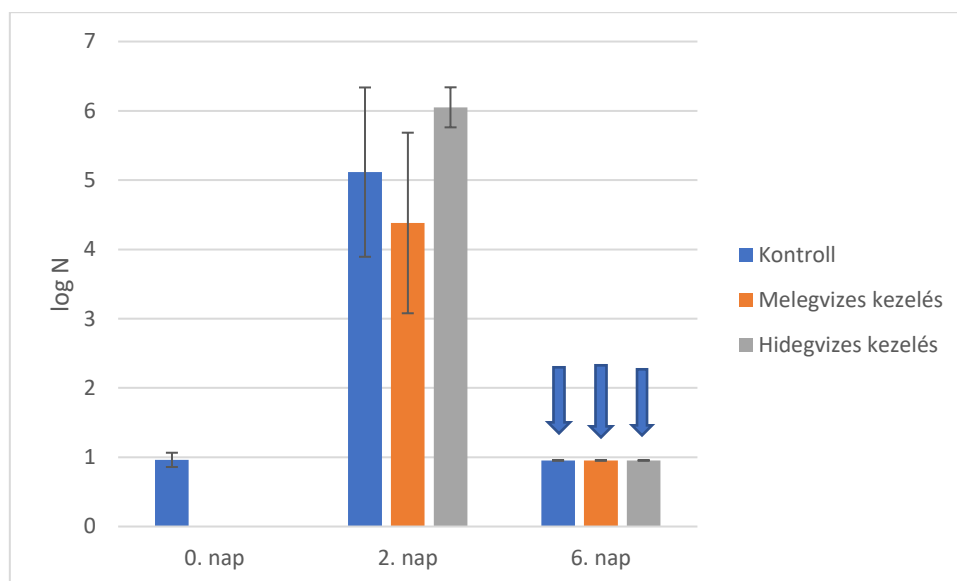
- 5) A *Pseudomonas aureginosa*-val beoltott zöld teát tartalmazó Petri csészékbe helyeztem a steril lemezeket, majd egy óráig 30°C-on inkubáltam. Ezalatt az idő alatt a sejtek egy része megtapadt a felületen.
- 6) Az öblítést már a korábbiakban ismertetett módon végeztem (4.2.1 1.) alapján).
- 7) Az inkubálási idő leteltével a kontroll lemezeket 5-5 ml steril vízzel öblítettem le, hogy a reverzibilisen felülethez tapadt sejteket eltávolítsam.
- 8) A teából a 0. napon az inkubálási idő letelte után, illetve a tárolás 2. és 6. napján mintát vettem, annak érdekében, hogy figyelemmel kísérjem a *Pseudomonas aeruginosa* koncentráció változást a teában.
- 9) A tamponos mintavételt már a korábbiakban ismertetett módon végeztem (4.2.1 1.) alapján).
- 10) A sejtszám meghatározásához lemezöntést végeztem; lemezöntés során 1 ml-t pipettáztam a mintákból, majd TGE tápagart öntöttem a Petri csészékbe, homogenizáltam, majd 30 °C-on két napig inkubáltam.

4.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm képzése teában, PET és PP felületen

- 1) A PET és a PP palackokat is steriliztem a 4.2.1 1.) pontban leírtak szerint.
- 2) Zöld teát főztem, a 4.2.3 2.) pontja szerint.
- 3) Az elkészített teát autoklávban sterilizáltam.
- 4) A palackokat steril teával megtöltöttem és 0,5 ml 24 órás friss tenyészetből készített, 10^5 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióval beoltottam.
- 5) A továbbiakban hasonlóan jártam el, mint a vízzel töltött és beoltott palackok esetén.

5 Kísérleti eredmények és kiértékelésük

5.1.1 Hideg-, és melegvizes eltávolítási módszer modell felületeken

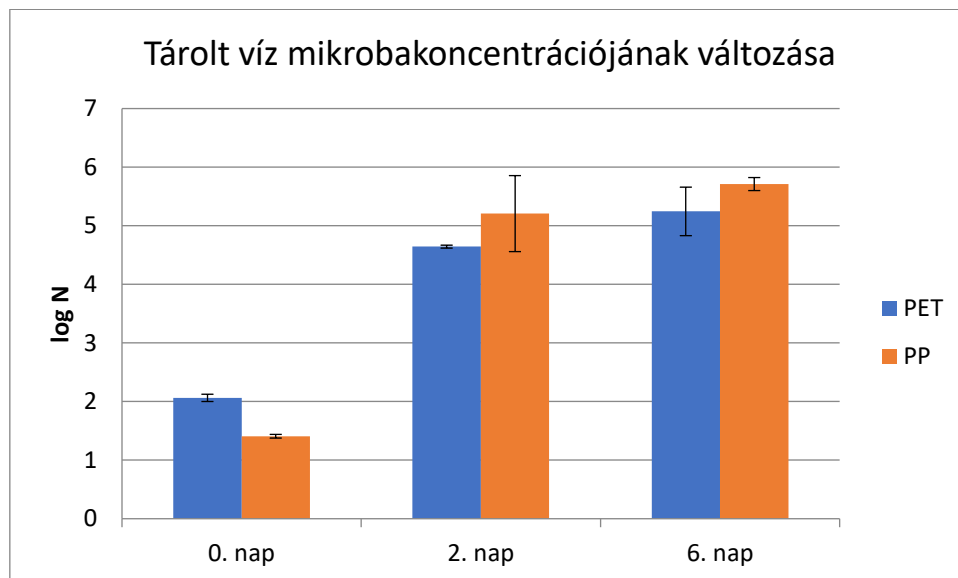


5. ábra: *Pseudomonas aeruginosa* modell biofilm kísérlet rozsdamentes acél felületén

A modell kísérleteket rozsdamentes acél felületen kezdtem. Az 5. ábrán látszik, hogy a két tisztítási eljárás hatékony volt, azonban az eredményeket elemezve nagyon nagy szórás volt tapasztalható, ami arra utal, hogy ilyen kis felületen nem lehet érdemben vizsgálni a különböző hőmérsékletű vízzel történő tisztítási kezeléseket.

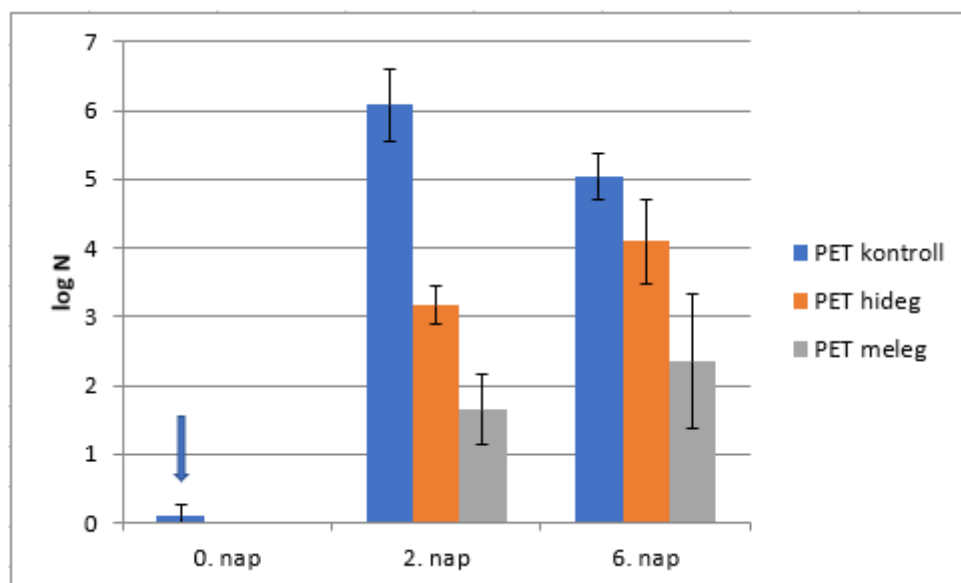
5.1.2 Hideg-, és melegvízes eltávolítási módszer PET és PP felületeken

A PET palackokkal és a polipropilén palackokkal végzett kísérlet:

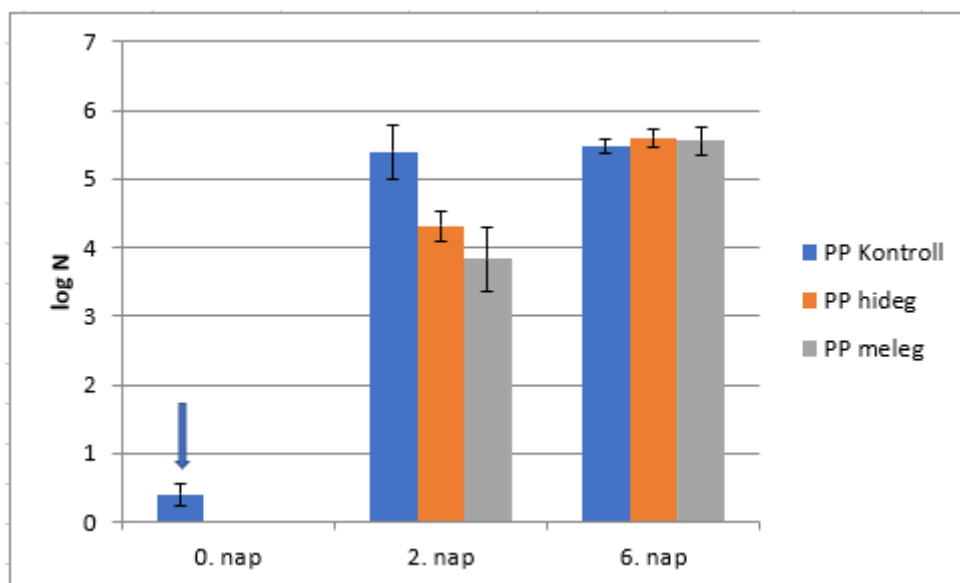


6. ábra: A PET és PP palackok vizéből vett minták összehasonlítása

A 6. ábrán látható az a tendencia, hogy mindkét típusú műanyag palackban tárolt vízben intenzív növekedés volt tapasztalható. A növekedés folytonos volt a 6. napig, de az ábráról az látszik, hogy a 0. és a 2. nap között volt ugrásszerű.



7. ábra: Hideg és meleg víz által kifejtett tisztítási hatékonyság PET palackok felületén



8. ábra: Hideg és meleg víz által kifejtett tisztítási hatékonyság PP palackok felületén

A 7. ábra és az elvégzett statisztikai elemzés alapján megállapítható, hogy szignifikáns hatása volt PET palackon a 2. napon mindkét mosásnak a kontrollhoz képest, valamint a 6. napon meleg vizes mosásnak a kontrollhoz képest is. Hideg víz hatására közel 3 nagyságrendnyi, meleg víz hatására 4,5 nagyságrendnyi mikrobakoncentráció csökkenés következett be.

PET palackban a 6. napon a hideg vizes mosás egy nagyságrendnyi csökkenést idézett elő, meleg vizes mosás ebben az esetben is hatékonyabbnak bizonyult, közel 3 nagyságrendnyi mikrobakoncentráció csökkenést okozott.

Burfoot és társai (2009) hasonló eredményekre jutottak, megállapították, hogy fertőtlenítőszeres hideg vizes mosás nem olyan effektív, mint a meleg vízzel történő öblítés.

A kétféle mosási módszer hatékonysága PP palackban (8. ábra) a 2. napon kisebb hatékonyságú volt a PET palackhoz képest, a hideg és meleg vizes öblítésnek egymáshoz viszonyítva közel egyforma hatása volt: egy nagyságrendnyi mikrobakoncentráció csökkenést idéztek elő. A kontrollhoz képest azonban a melegvizes kezelés szignifikáns telepszám csökkenést okozott.

A tisztítási eljárások PP palackban a 6. nap egyáltalán nem voltak hatékonyak.

A kétféle műanyagot összehasonlítva: PET palackban hatékonyabb volt az öblítéses mosás, mindkét hőmérsékletű vízzel.

A kontroll PET és PP palackok felületén kitapadó mikrobakoncentrációt összehasonlítva megállapítható, hogy a PET palackban a tárolás 6. napjára már csökkent a mikrobaszám a 2. naphoz képest. Ezzel szemben a PP palack felületén kitapadt mikrobakoncentráció közel azonos volt.

Az előző kutatásokban Dancs (2020) azt a megállapítást tette, hogy a vízben szabadon lévő *Pseudomonas aeruginosa* sejtek száma a beoltástól számított 2. napig 4 nagyságrendet nőtt. A 6. napra egy nagyságrendet csökkent. A felületeken megtámadó biofilm koncentráció a 6. napra további növekedést mutatott. Ehhez képest a saját kísérleteimben a vízben szabadon lévő sejtek esetén a 2. napra a PET palack esetében több, mint 2,5 nagyságrend növekedést tapasztaltam, a PP palack esetében pedig több, mint 3,5 nagyságrendet nőtt a mikróbakoncentráció. A hatodik nap esetén csökkenést tapasztaltam. A felületeken megtapadó sejtek száma kísérleteim során a 6. napra a PP palack esetében stagnálást mutatott, a PET palack esetében pedig csökkent. A különbséget Dancs munkája és a saját eredményeim között az adhatja, hogy szobahőmérsékleten végeztük a kísérleteket, ami nem tekinthető állandónak.

5.1.3 Tisztítási módszerek hatékonysága

Dolgozatom két másik diplomadolgozat folytatása, ezért fontosnak tartottam összehasonlítani az adataimat az előzőekben kapott adatokkal. Juhász 2020-ban készített diplomamunkájában a *Sphingomonas yanoikuyae* mikroorganizmussal dolgozott, ami egy Gram-negatív baktérium, ahogyan a *Pseudomonas aeruginosa* is. Juhász a tisztítási kísérlet során a mosogatószeres öblítést és a súrolást vizsgálta. A két módszer összehasonlítására nem kapott egyértelmű eredményt.

Dancs (2020) diplomamunkájában a tárolási kísérletek során megállapította, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* a PET és a polipropilén palackba töltött víz esetén is hasonlóan viselkedett.

Dancs öblítéses és súrolásos biofilm eltávolítási módszereit hasonlítottam össze a saját melegvizes és hidegvizes kezeléseim eredményeivel. Az összehasonlítás során az adott kezeléseknél az adott kezeléshez tartozó kontroll értékekhez viszonyított eltávolítás mértékét fejeztem ki százalékos formában.

9. táblázat: A különböző biofilm eltávolítási módszerek hatékonyságának összehasonlítása
PET palackok felületén

	2. nap(%)	6. nap (%)
Öblítés	61	56,9
Súrolás	89,4	92,7
Hideg vizes kezelés	48,03	18,69
Meleg vizes kezelés	73,03	53,28

10. táblázat: A különböző biofilm eltávolítási módszerek hatékonyságának összehasonlítása
PP palackok felületén

	2. nap(%)	6. nap (%)
Öblítés	55,3	7,1
Súrolás	86,6	94,3
Hideg vizes kezelés	20,04	0
Meleg vizes kezelés	28,94	0

A 9. és 10. táblázatból megállapítható, hogy az öblítés és a súrolás nagy hatékonysággal távolítják el a biofilmet.

Összehasonlítva a négy eltávolítási lehetőséget, a leghatékonyabbnak a súrolás bizonyult, a PET és a PP anyagon is, a 2. és a 6. nap esetében is.

Dancs öblítéses biofilm eltávolítási kísérlete és a hideg vizes kezelés ugyanazon módszeren alapul. A hatékonyságbeli különbség abból adódhat, hogy biológiai rendszerekkel dolgoztunk, illetve a laboratórium hőmérséklete nem állandó.

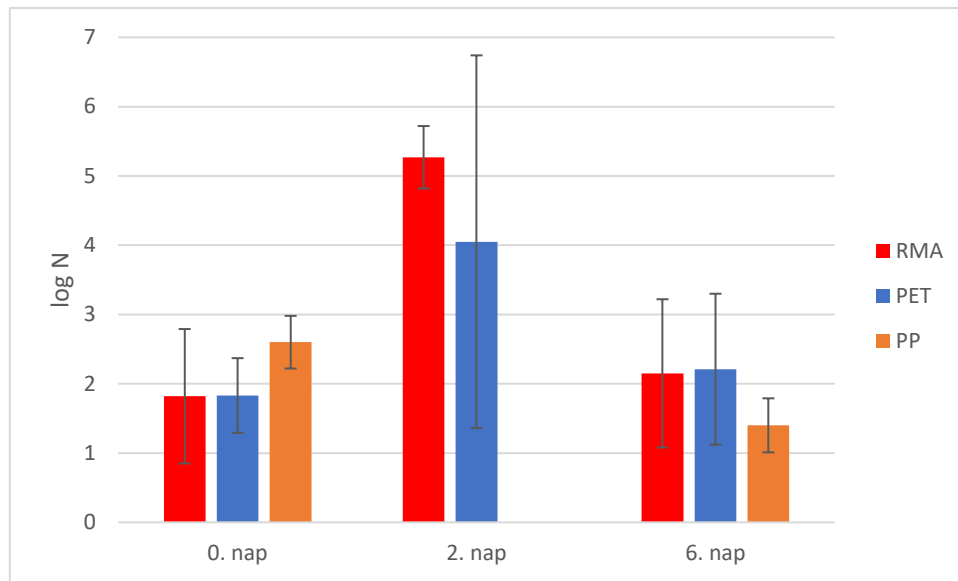
Az érett biofilm ellen tehát csak a súrolás tudja hatékonyan felvenni a versenyt. A hideg vizes kezelés hatékonysága volt a legalacsonyabb, közel 30% hatékonyságcsökkenést figyeltem meg a 2. és a 6. nap mintavételei között.

A PP palackok esetében is a súrolást találtam a leghatékonyabbnak. A meleg- és a hidegvizes kezelések hatékonyságában nincs számottevő eltérés a 2. napon. A 6. napon az eredmények a nagymértékű szórás miatt nem voltak érdemben értékelhetőek, lényegében a kezelés a 6. napon nem változtatott a baktériumok számán a kontrollhoz képest.

A két anyag esetében a súrolás hasonlóan hatékony volt, a 2. nap adatait figyelembe véve. Elmondható, hogy a polipropilén palackok felületéről az általam alkalmazott hideg- és melegvizes kezelések nem távolították el a biofilmet jelentős mértékben.

5.1.4 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm képzése teában, modell felületeken

Összehasonlító elemzést végeztem a tea esetében is. Munkámat egy modell kísérlettel kezdtem, hogy pontosan lássam, milyen anyagokkal és milyen koncentrációval szeretnék dolgozni, valamint a hígítási tagok megállapítása is fontos szempont volt.



9. ábra: Biofilm képzés teában modell felületeken

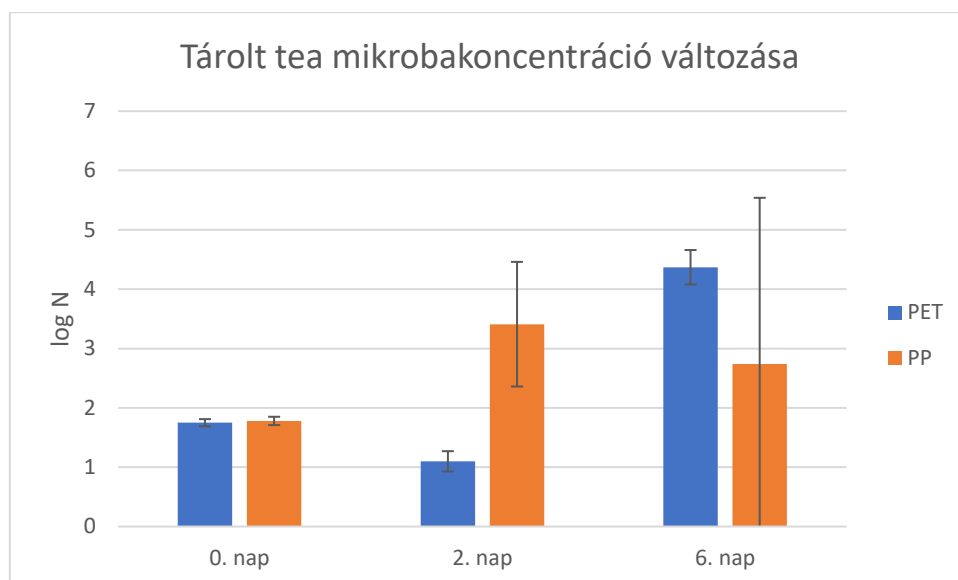
A 9. ábra alapján a második mintavételi napon a PP lemezeken nem nőttek ki a kitenyésztett baktériumok, ami mérési hiba miatt is történhetett.

Látható, hogy a második napon a legnagyobb a *Pseudomonas aeruginosa* sejtkoncentrációja a lemezek felületén, de tekintettel a nagy szórás értékekre, egyik napon sem volt szignifikáns különbség kimutatható a három anyag között.

A lemezek közül a rozsdamentes acél lemez felületén figyelhető meg a legnagyobb mikrobakoncentráció növekedés. A beoltástól számítva a 2. napra közel 3 nagyságrend növekedés volt tapasztalható. A PET lemezek esetén ez a növekedés közel 2 nagyságrendnyi. Mindhárom lemez esetén elmondható, hogy a koncentráció a 6. napra csökkent (2-3 nagyságrenddel).

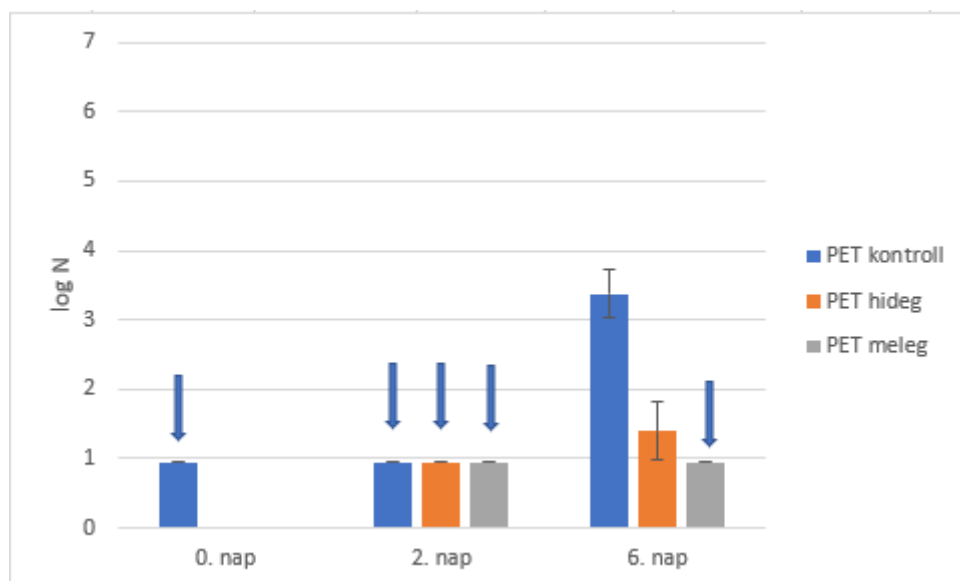
5.1.5 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm képzése teában, PET és PP felületen

Korábban vízzel töltött műanyag palackok belső felületén követtem nyomon a biofilm képződést és annak eltávolítási lehetőségeit. Ebben a fejezetben a zöld teával töltött palackokkal végzett kísérletek eredményeit mutatom be.

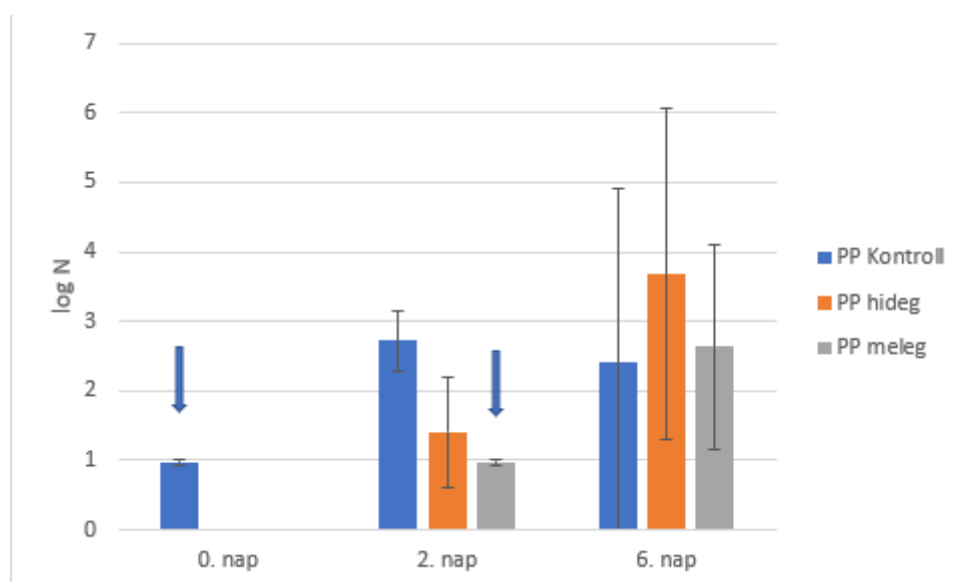


10. ábra: A PET és PP palackban tárolt teából vett minták összehasonlítása

A 10. ábrán látható, hogy a 0. napon a beoltás után mindkét anyagon hasonlóan alakul a mikrobakonzentráció. A 2. napon a PET palackokból vett minták esetén a koncentráció csökkent, a PP palackokból vett minták esetén pedig nőtt. A 2. napon a PET palackokból és a PP palackokból detektálható *Pseudomonas aeruginosa* mennyisége szignifikánsan különbözik. A 6. napra mindkét anyagú palackból vett minta mikrobakonzentrációja nőtt.



11. ábra: Hideg és meleg víz által kifejtett felület tisztítási hatékonyság PET palackban tárolt tea esetében



12. ábra: Hideg és meleg víz által kifejtett felület tisztítási hatékonyság PET palackban tárolt tea esetében

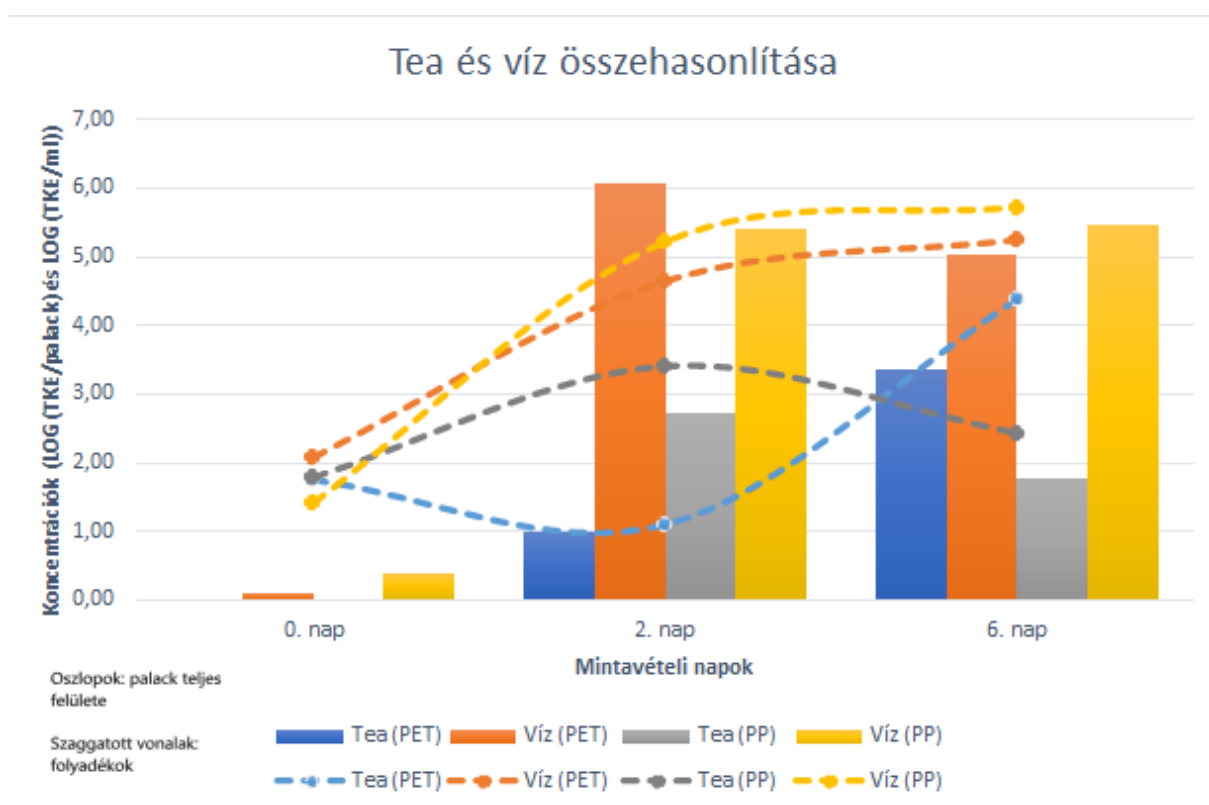
A 11. ábra alapján a tea esetében a 2. napon a PET palackok felületén kitapadt sejtkoncentráció a hidegvizes és melegvizes kezelésekre megegyezik. A kezelésekre és a kontroll között sincs különbség, azonban a 6. napon kontroll és a kezelésekre között szignifikáns különbség van. A sejtkoncentráció is látványosan csökkent a kontrollhoz képest a kezelésekre hatására. A PET palackok esetében elmondható, hogy a hidegvizes és a melegvizes öblítés is hatékonynak bizonyult.

A PP palackokban (12. ábra) a 2. napon a kontroll és a kezelések között szignifikáns különbség van.

A teával végzett kísérletekben különösen nagy szórás volt tapasztalható, ami miatt a kísérletek ismétlésére lenne szükség.

5.1.6 Tea-víz összehasonlítás

A dolgozatomban célkitűzése összehasonlítani a víz és a tea közötti különbséget, olyan szempontból, hogy melyik közegben nagyobb a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium biofilmképzési hajlandósága.



13. ábra: Biofilm koncentráció teában és vízben, PET és PP palackok belső felületén

A 13. ábrán szereplő oszlopok adatai a palack teljes felületének mikrobakonzentrációjára vonatkoznak ($\log(\text{tke/palack})$), a szaggatott vonalakkal a palackban tárolt folyadékok mikrobakonzentrációját jelöltem ($\log(\text{tke/ml})$). Így az adatok nem összevethetőek ugyan, de az ábra segítségével koncentráció változás tendenciája nyomonkövethető. Annak érdekében, hogy a tendencia szemléletesebben kirajzolódjon, a folyadékok adataira vonatkozó pontokat összekötöttem.

Eredményeim azt mutatják, hogy a vízben könnyebben elszaporodott a *Pseudomonas aeruginosa*. Számomra meglepő volt, hogy a cukorral ízesített zöld teát tartalmazó palackok felületén, illetve magában a teában is a vízhez képest alacsonyabb volt a sejtkoncentráció, de Kwang Y. Kim és munkatársai hasonló eredményeket kaptak 1996-ban. Megállapították, hogy a 20 g/l cukorkoncentráció nem befolyásolja a megtapadó sejtek mennyiségét.

A 13. ábra segítségével párhuzamot vontam palack felületére kitapadt biofilm koncentrációja víz és tea viszonylatában. A 2. nap eredményeiből látható, hogy a PET és a PP palackból vett vízminták esetében is magasabb volt a mikrobakoncentráció, mint a teát tartalmazó palackok mintáiban. A 2. napon a PET palackokban nagyobb különbség volt mérhető a kitapadt sejtek koncentrációjában, mint a PP palackok esetében.

A szabad sejtek esetében a 0. napon a vizet tartalmazó PP palackok koncentrációja volt a legalacsonyabb, de ez a 2. napra megfordult. Hasonló változás figyelhető meg a teát tartalmazó palackok esetében; a 2. napon még a PP palackokból vett minták mikrobakoncentrációja magasabb volt, de ez a 6. napra megfordult, és a PET palackok mikrobakoncentrációja növekedett.

A *Pseudomonas aeruginosa* vízben jobban szaporodik, mint teában, amit a teában található gátló anyagok, például a polifenolok jelenléte indokol. Reygaert és társai 2014-ben írt tanulmányukban arról számoltak be, hogy a teában található polifenolok károsítják a baktériumsejt membránját és gátolják az enzimaktivitást. A polifenolok a membrán károsítása miatt a biofilm képzést is ellehetetlenítik.

6 Összefoglalás

A saját kutatásomban a polietilén-tereftalát és a polipropilén palackot választottam a biofilm képzési folyamat anyagaként.

Céljaim között szerepelt, hogy a különböző felületekhez tapadt biofilmeket eltávolítsam, melyhez mosogatószerrel kombinált hidegvizes (18 °C) és melegvizes (60 °C) kezeléseket használtam. A két típusú kezelést vetettem össze, valamint összehasonlítottam a kezelések hatékonyságát Dancs 2020-ban elvégzett kezeléseinek hatékonyságával. Arra a megállapításra jutottam, hogy a meleg vizes kezelés több, mint 73%-ban eltávolította a felületre tapadt sejteket. A jobb eltávolítási hatékonyság érdekében a melegvizes kezelést mechanikai kezelésekkal (pl. súrolás) kell kombinálni.

Másik célkitűzésem volt, hogy megállapítsam, hogy a teában vagy a vízben növekedik jobban a *Pseudomonas aeruginosa* és melyik közegben képez hatékonyabban biofilmet. Megállapítható, hogy a teában is elszaporodtak a baktériumok, de a vízben nagyobb mikrobakonzentráció volt megfigyelhető. A PET palackok esetében elmondható, hogy a hidegvizes és a melegvizes öblítés is hatékonynak bizonyult. A PP palackok esetében a kezelések között nem volt különbség. A túl nagy szórások miatt a kísérletek megismétlése szükséges.

Dancs (2020) súrolási kísérlete majdnem 100%-os hatékonysággal távolította el akár az érett biofilmet is. Távlati cél lehet a hatékonyság növelésének érdekében a súrolást meleg vizes kezeléssel és fertőtlenítőszerrel kombinálni. További anyagokon, például PVC vagy üveg felületeken elvégzett kísérletek is megfontolandók.

Összességében elmondható, hogy az újra felhasználható palackok nagy részét minden nap el kellene mosogatni, melegvízzel és mosogatószerrel, hogy elkerüljük a biofilm kialakulását. Ezen kívül a palackok rendszeres cseréje, rendkívül fontos, illetve, ha érzékszervi változást tapasztalunk a palackban tárolt italokban.

7 Irodalomjegyzék

1. D. S. Arora , G. J. Kaur, H. Kaur (2009) Antibacterial Activity of Tea and Coffee: Their Extracts and Preparations. *International Journal of Food Properties*, 12 (2): 286-294, DOI: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10942910701675928>
2. M. Bassetti, A. Vena, A. Croxatto, E. Righi, B. Guery (2018) How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*. 7: 212-527 DOI: <https://www.drugsincontext.com/how-to-manage-pseudomonas-aeruginosa-infections/>
3. D.Burfoot, K.E.Middleton, J.T.Holah (2009). Removal of biofilms and stubborn soil by pressure washing, *Trends in Food Science & Technology*, 20 (1): S45-S47, DOI: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224409000144?casa_token=ZDA1NznoOhAAAAAA:nIaSCE_f7F6m0T3GFqM5RoQKOMm2M7qhYzTBTKxvw5ldQnMRsO7P-6HMb7efJz8z8-DgqGLQ
4. Dancs V. (2020) Műanyag palackokban képződött biofilmek és azok eltávolítási módszereinek összehasonlítása. Diplomamunka.
5. H.-C. Flemming, T. R. Neu, D. J. Wozniak (2007). The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J Bacteriol*, 189(22): 7945–7947. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168682/>
6. G. Gebreyohannes, A. Nyerere, C. Bii, D. B. Sbhatu (2019). Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms, *Heliyon* 5 (8). DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844019358529>
7. N.B Hallam, J.R West, C.F Forster, J Simms (2001) The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Research*, 35 (17): 4063-4071, DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135401002482>
8. K. K. Jefferson (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*. 236 (2): 163–173. DOI: <https://academic.oup.com/femsle/article/236/2/163/535288?login=false>
9. Juhász, I. (2020): Biofilm képződés vizsgálata kereskedelemben kapható műanyag palackokban. Diplomamunka.

10. K. Y. Kim, J. F. Frank (1995) Effect of Nutrients on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel. *J Food Prot*, 58 (1): 24–28. DOI: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/58/1/24/166820/Effect-of-Nutrients-on-Biofilm-Formation-by>
11. G. Kiskó, O. Szabó-Szabó (2011) Biofilm removal of *Pseudomonas* strains using hot water sanitation. *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*, 4, 69–79. DOI: <http://www.acta.sapientia.ro/acta-alim/C4/alim4-6.pdf>
12. S. Liu, C. Gunawan, N. Barraud, S. A. Rice, E. J. Harry, R. Amal (2016) Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. *Environ. Sci. Technol.* 50 (17): 8954–8976. DOI: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.6b00835>
13. J.-S. Peng, W.-C. Tsai, C.-C. Chou (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology*, 77 (1-2): 11-18. DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502000600>
14. V. C. Reddy, G. V. Vidya Sagar, D. Sreeramulu, L. Venu, M. Raghunath (2005). Addition of milk does not alter the antioxidant activity of black tea. *Ann Nutr Metab* , 49(3):189-95. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020939/>
15. W. C. Reygaert The antimicrobial possibilities of green tea (2014) *Front. Microbiol.* DOI: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00434/full>
16. G. Sharma, S. Rao, A. Bansal, S. Dang, S. Gupta, R. Gabrani (2014) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals* 42 (1): 1-7 DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1045105613001334>
17. M. Toda, S. Okubo, R. Hiyoshi, T. Shimamura (1989). The bactericidal activity of tea and coffee. *Letters in Applied Microbiology*, 8 (4): 123-125 DOI: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00255.x>
18. M. Toyofuku, T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata, N. Nomura (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 80(1): 7-12. DOI: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2015.1058701>
19. A. Vidyasagar (2016). What Are Biofilms? *Live Science*. DOI: <https://www.livescience.com/57295-biofilms.html>

20. V. Voora, S. Bermúdez, C. Larrea (2019). Global Market Report: Tea. *The International Institute for Sustainable Development*, DOI: <https://www.iisd.org/system/files/publications/ssi-global-market-report-tea.pdf>
21. K. W. Warwick, M. Ware (2021). What are the health benefits of green tea? *Medical News Today*. DOI: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/269538#skin-conditions>
22. Wijesinghe G., Dilhari A., Gayani B., Kottegoda N., Samaranayake L., Weerasekera M. (2019) Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Med Princ Pract* 28: 28–35. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30352435/>
23. H. Yin, Y. Deng, H. Wang, W. Liu, X. Zhuang, W. Chu (2015) Tea polyphenols as an antivirulence compound Disrupt Quorum-Sensing Regulated Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Scientific Reports* volume 5, Article number: 16158. DOI: [Tea polyphenols as an antivirulence compound Disrupt Quorum-Sensing Regulated Pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa | Scientific Reports \(nature.com\)](https://doi.org/10.1038/srep16158)
24. Internet 1: A felnőtt lakosság számára javasolt napi vízfogyasztásról <https://asvanyvizek.hu/mit-kell-tudni-az-asvanyvizrol/folyadekpotlas/>
25. Internet 2: A nemzeti nozokominális serveillance rendszer 2018. évi eredményeiről 14-15 DOI: https://www.antsz.hu/data/cms93503/NNSR_2018.pdf
26. Internet 3: 201/2001. (X. 25.) Korm. rendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0100201.kor>
27. Internet 4: A víz esszenciális tulajdonságai az emberi szervezetre nézve <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/water-you-water-and-human-body>
28. Internet 5: Az ivóvíz minőségi paraméterei <https://www.driv.hu/ivoviz-minosegi-parameter-hatarertekei-es-jellemzoi>
29. Internet 6: *Pseudomonas aeruginosa* határértékei ivóvízben <https://www.nnk.gov.hu/index.php/kozegeszsegugyi-laboratoriumi-foosztaly/kornyezetegeszsegugyi-laboratoriumi-osztaly/vizhigienes-laboratorium/ivoviz/ivovizben-vizgalt-parameterek/1021-pseudomonas-aeruginosa>

30. Internet 7: Tudomány.hu Milyen az ivóvíz magyarországon? M. Vargha (2019) DOI: https://tudomany.hu/cikkek/milyen-az-ivoviz-magyarorszagon-109563#_edn1
31. Internet 8: Tea fogyasztás világszerte (Élelmiszerügyi és Mezőgazdasági Világszervezet) <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/tea/en/>
32. 1. ábra forrása: V. Ranganathan (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. Journal of Microbiology & Experimentation 1 (3).
33. 2. ábra forrása: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-03477-4>
34. 3. ábra forrása: <https://www.sciencephoto.com/media/41023/view/camellia-sinensis->

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: ERDŐS HAJNALKA
A Hallgató Neptun kódja: UD3QNG
A dolgozat címe: KÜLÖNBÖZŐ KÖZEGEKKEL ÉRINTKEZŐ HÚANYAG PALACSBAN
KEPZŐDŐ BIOFILM KIMUTATÁSA ÉS ELTÁVOLÍTÁSA
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: ÉLELMISZER-MIKROBIOLOGIA, -HIGIÉNIA ÉS -BIZTONSÁG

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat 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: BUDAPEST 2023 év APRILIS hó 26 nap

Erdős Hajnalka
Hallgató aláírása

**KONZULTÁCIÓS
NYILATKOZAT**

ERDŐS HAJNALKA (UD3QVG) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozator¹ áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem³

Kelt: Budapest, év 2023. április 26.


Tacsmané dr. Brückner Andrea
Belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozat típus megnevezése mellett a többi típus törendő.

² A megfelelő aláírandó.

³ A megfelelő aláírandó.
