

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

KÜLÖNBÖZŐ KÖZEGEKKEL ÉRINTKEZŐ MŰANYAG PALACKBAN KÉPZŐDŐ BIOFILM KIMUTATÁSA ÉS ELTÁVOLÍTÁSA

Detection and removal of biofilm in plastic bottles filled with different beverages

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Budapest

Témavezető: Taczmanné dr. Brückner Andrea, egyetemi adjunktus

Összefoglalás

Kutatómunkám során a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium biofilm képző képességét és eltávolításának lehetőségét vizsgáltam vízben és zöld teában. Korábbi modell kísérletek alapján biofilm eltávolítási kísérletet végeztem műanyag palackokban a hideg- és melegvizes öblítés hatékonyságának összehasonlítása érdekében. Kutatásom további részében cukorral ízesített zöld teával végeztem modell felületeken kísérletet. A biofilm teával töltött műanyag palackban való kialakulásának, illetve a tisztítási módszerek hatékonyságának vizsgálatával fejeztem be munkámat.

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. 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. Ezek az anyagok a vízben található természetes mikroorganizmusok elszaporodásuk miatt 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. Háztartásainkban a biofilmek eltávolításának leghatékonyabb lehetősége a mosogatás. A mosogatást 18 °C és 65 °C-os vízzel és mosogatószerrel modelleztem laboratóriumi közegben.

2. Anyagok és módszerek

Biofilm modell elkészítéséhez szükséges anyagok (víz és tea közegben)

Polipropilén lemez, rozsdamentes acél lemez, polietilén teraftalát lemez, Kereskedelemben kapható szénsavmentes ásványvíz palackok (0,5 liter), Kereskedelemben kapható polipropilén anyagú kulacs, 70%-os alkohol, steril csapvíz, filteres zöld tea (Nатурland), cukor

Biofilm eltávolítására vonatkozó kísérletekhez szükséges anyagok

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

Felhasznált mikroorganizmusok

Pseudomonas aeruginosa ATCC9027

Felhasznált tápközegek

Trypton Glükóz Élesztőkivonat – TGE általános táptalaj, 9 ml-es hígító folyadék, R2A tápleves, Trypton szója agar - TSA általános táptalaj

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. A PET lemezeket 70%-os alkoholba merítettem, a PP és rozsdamentes acél lemezeket pedig autoklávban csíramentesítettem. A kísérletekhez egy 24 órás friss, 10^8 sejt/ml koncentrációjú tenyészetet használtam. Az elkészített szuszpenzióból 1 ml-t pipettáztam 100 ml R2A tápleveshez. A beoltott táplevesbe helyeztem a lemezeket, majd egy óráig 30°C-on inkubáltam. A lemezek egyharmad részét 5-5ml steril desztillált vízzel öblítettem a reverzibilisen megtapadt sejtek eltávolítása végett (0. nap kontroll), kétharmad részét öblítést követően steril R2A táplevesbe helyeztem és inkubáltam 30°C-on 2 illetve 6 napig. Az inkubálási idő leteltével a kontroll lemezeket 5-5 ml steril vízzel öblítettem le (2. és 6. nap kontroll). A „hideg” lemezeket 5 ml steril vízzel történő öblítés után további 10 ml hideg steril vízzel öblítettem le. A „meleg” lemezeket további 10 ml 60 °C-os steril vízzel kezeltem. A lemezeken megtapadt mikrobák számszerű kimutatásához mintavételi alkalmanként 3-3 lemezről tamponos mintavevőt használtam, melyet a mintavételt követően a hígító folyadékba mostam. Szükség szerint hígítási sort és lemezöntést készítettem. További 3 lemezt epifluoreszcens mikroszkóp alatt is megvizsgáltam (100-szoros nagyítású homogén immerzió), ehhez a lemezeket akriddinnarancs festékkel festettem meg (0,02 g/ 100 ml víz), amit 2 percig állni hagytam, majd leöblítettem.

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).

A cukorral ízesített teába helyezett modell lemezekkel az előzőeknek megfelelően jártam el.

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

A palackokat a modell kísérletben leírtaknak megfelelően steriliztem vagy alkohollal öblítettem át. Friss, 10^8 sejt/ml koncentrációjú *Pseudomonas aeruginosa* tenyészetet használtam. A steril palackokba fél liter steril vizet töltöttem, amibe 0,5 ml 10^5 koncentrációjú hígított szuszpenziót pipettáztam. A palackokat szobahőmérsékleten inkubáltam 6 napig. A palackokban tárolt vízből és a palackok felületéről a 0., 2. és 6. napon mintát vettem, a mikrobaszám meghatározáshoz szükség szerint hígítási sort készítettem, lemezöntést végeztem, a lemezeket 30°C-on inkubáltam. A palack felületének vizsgálatához a palackokból a tárolt vizet kiöntöttem. A kontroll palackok esetében közvetlenül ezután mintát vettem tamponos mintavevővel. A tisztítási eljárás modellezéséhez hideg és meleg vizes kezeléseknek megfelelő hőmérsékletű (18°C/60°C) 100 ml mosogatószeres steril vízzel öblítettem át a palackokat, majd 100 ml steril öblítővizet használtam a hab eltávolításához. A palackok teljes belső felületéről tamponos módszerrel mintát vettem (a PET palackok esetében forró szikével kettévágtam a palackot, hogy a mintavevővel jól hozzáférjek minden részéhez.). Szükség szerint hígítási sort készítettem és lemezöntést végeztem. A lemezeket 30°C-on, 2 napig inkubáltam.

A cukorral ízesített teával töltött palackokkal a fent leírt módszernek megfelelően jártam el.

3. Eredmények és értékelésük

Rozsdamentes acél felületen a két tisztítási eljárás hatékony volt, azonban a nagy szórás arra utal, hogy ilyen kis felületen nem lehet érdemben vizsgálni a különböző hőmérsékletű vízzel történő tisztítási kezeléseket. A három lemez felületén (rozsdamentes acél, PET és PP) a sejtkoncentrációkban nem volt szignifikáns különbség.

A tea esetében a második napon a legnagyobb a *Pseudomonas aeruginosa* sejtkoncentrációja a lemezek felületén, de nem tér el a szignifikánsan a többi anyagtól a koncentráció. A lemezek közül a rozsdamentes acél lemez felületén figyelhető meg a legnagyobb mikrobakoncentráció növekedés. Mindkét közegben minden lemez esetén csökkent a sejtkoncentráció a 6. napra.

A PET palackokban a szórás értékeket figyelembe véve szignifikáns hatása volt a 2. napon mindkét mosásnak a kontrollhoz képest, valamint a meleg vizes mosásnak a hideg vízhez képest is. PET palackban a melegvizes mosás hatékonyabbnak bizonyult.

A kétféle mosási módszer hatékonysága PP palackban a 2. napon kisebb hatékonyságú volt a PET palackhoz képest, a hideg és meleg vizes öblítésnek egymáshoz viszonyítva közel egyforma hatása volt.

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

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

A PP palackokban a kezelések között nincs különbség.

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.

4. Következtetések, javaslatok

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.

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 romlást tapasztalunk a palackban tárolt italokban.

5. Irodalom

- I. 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>
- II. W. C. Reygaert The antimicrobial possibilities of green tea (2014) *Front. Microbiol.* DOI: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00434/full>