

SZAKDOLGOZAT

Borosi Bernadett Szakdolgozat

Borosi Bernadett

2023



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

Lactobacillus paracasei törzsek antibiotikum
érzékenységének vizsgálata

Borosi Bernadett

Budapest

2023

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

Szak neve: BSc Biomérnök

Modul neve: Alkalmazott biotechnológia

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék


Hallgató: Borosi Bernadett

A szakedolgozat címe: *Lactobacillus paracasei* törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata


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

Külső konzulens esetén tanszéki felelős: -

Beadás dátuma: 2023.05.03


szakedolgozat készítés helyének vezetője
(Dr. Nguyen Duc Quang)


konzulens
(Kosztik Judit)


Dr. Nguyen Duc Quang
modul szerinti tanszék vezetője

*Nem kívánt rész törölendő!

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzések	2
3. Irodalmi áttekintés	3
3.1. Tejsavbaktériumok.....	3
3.1.1. Tejsavbaktériumok általános jellemzése.....	3
3.1.2. Tejsavbaktériumok rendszertana.....	3
3.1.3. <i>Lactobacillus</i> nemzetség.....	4
3.1.4. Tejsavbaktériumok anyagcseréje.....	5
3.2. Az emberi és állati bélflóra.....	5
3.3. Tejsavbaktériumok mint probiotikumok.....	6
3.4. Prebiotikumok.....	7
3.5. Antibiotikumok általános jellemzése.....	7
3.6. Antibiotikumok csoportosítása.....	8
3.7. Antibiotikumok hatásmechanizmusa.....	8
3.8. Vizsgálataim során használt antimikrobás szerek.....	9
3.9. Antibiotikum rezisztencia megszerzése.....	11
3.10. Szerzett antibiotikum rezisztencia mechanizmusai.....	11
3.11. Antibiotikumok takarmányként történő felhasználásának problémái.....	13
3.12. Bürker-kamrás Sejtszámlálás.....	13
3.13. Korongdiffúzió.....	14
3.14. Abszorbancia mérés.....	15
4. Anyagok és módszerek	16
4.1. Alkalmazott táptalajok.....	16
4.2. Vizsgált törzsek.....	17
4.3. Bürker-kamrás Sejtszámlálás.....	17
4.4. Korongdiffúzió.....	17
4.5. Abszorbancia mérés.....	19
5. Eredmények és értékelésük	20
5.1. Bürker-kamrás sejtszámlálás.....	20
5.2. Korongdiffúzió.....	22
5.3. Abszorbancia mérés.....	25
6. Következtetések és javaslatok	29
7. Összefoglalás	30
8. Irodalomjegyzék	31

9. jegyzékek	35
9.1. Ábrajegyzék	35
9.2. Táblázatjegyzék.....	35
Köszönetnyilvánítás.....	36

Borosi Bernadett Szakdolgozat

1. BEVEZETÉS

A tejsavbaktériumok szénhidrát fermentálás során tejsavat termelnek, melynek köszönhetően az élelmiszeriparban régóta használják őket zöldségek, tejtermékek, illetve húskészítmények tartósítására. Egyes tejsavbaktériumokat probiotikumként is alkalmaznak a fogyasztó egészségére gyakorolt jótékony hatásai miatt, mind embereknél, mind az állattenyésztésben.

Az elmúlt évtizedekben aggodalomra ad okot az antibiotikum-rezisztencia terjedése. A legfőbb aggodalom a kórokozó baktériumok és azok antibiotikum rezisztenciája miatt van, mivel a rezisztens mikrobák által okozott fertőzések kezelése nem csak bonyolultabb, de időigényesebb és sokkal költségesebb is.

Mivel a tejsavbaktériumok nagy mennyiségben vannak jelen a gyomor-bél traktusban, és szándékosan is bekerülnek étrendünkbe, illetve állatok takarmány adalékanyagaként is alkalmazzák, így aggodalmak merültek fel antibiotikum-rezisztenciájuk miatt. Bizonyos antibiotikumokkal szemben rezisztens tejsavbaktériumok előnyösek lehetnek a gazdaszervezetnek azáltal, hogy elősegítik a gyomor-bél traktus egyensúlyának fenntartását az antibiotikum kezelés okozta hasmenés esetén. Ugyanakkor fennáll annak a kockázata, hogy ezek a rezisztens törzsek képesek a rezisztenciagént más, esetleg patogén baktériumoknak továbbadni. Ez megnehezítheti az antibiotikum rezisztens bakteriális betegségben szenvedő beteg kezelését. Ezért a megengedettnél nagyobb mértékű antibiotikum rezisztenciával rendelkező törzsek nem alkalmazhatóak sem élelmiszerekben, sem takarmány kiegészítőként.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Szakdolgozatom készítésekor célul tűztem ki a *Lactobacillus paracasei* fajhoz tartozó olyan törzsek kiválasztását a törzsgyűjteményből, melyek nem rendelkeznek antibiotikum rezisztenciával, így potenciálisan hasznosak lehetnek az élelmiszeriparban vagy állati takarmány adalékanyagként. E mellett céлом volt olyan antibiotikumok kiválasztása és vizsgálata, melyekkel szembeni rezisztencia kizárja a törzseket a probiotikumként történő alkalmazás lehetőségéből.

A cél elérése érdekében a következő vizsgálatokat terveztem megvalósítani:

- A kiválasztott törzsek sejtszámának Bürker-kamrával történő számlálása, a kísérletekhez szükséges egységes sejtkoncentráció biztosításához
- A törzsek antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata korongdiffúziós módszer segítségével
- Abszorbancia mérésen alapuló antibiotikum rezisztencia meghatározása

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. TEJSAVBAKTÉRIUMOK

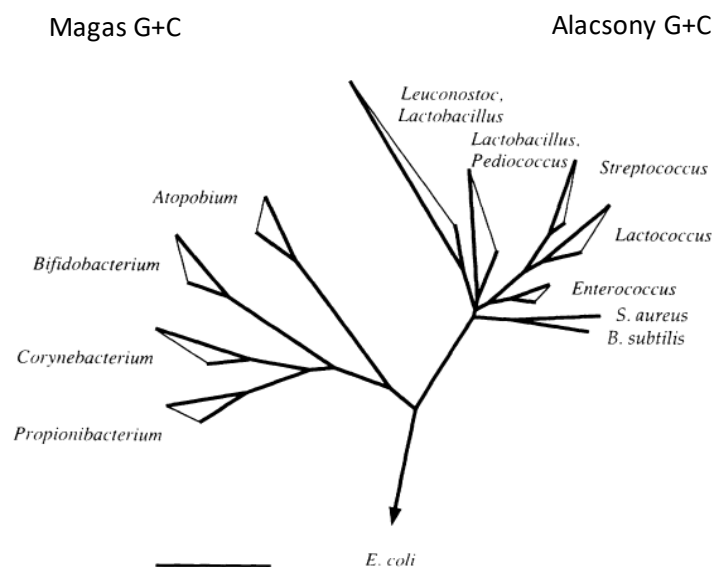
3.1.1. TEJSAVBAKTÉRIUMOK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

A tejsavbaktériumok élelmiszeriparban történő alkalmazása hosszú múltra tekint vissza. Mivel a tejsav csökkenti a közeg pH-ját, ennek révén gátolja a romlást okozó mikrobák elszaporodását, így különböző tejtermékek, zöldségek, valamint húskészítmények eltarthatóságát elősegítheti.

A tejsavbaktériumok Gram-pozitív, spórát nem képző, kataláz-negatív pálcika vagy kokkus alakú mikrobák. Anyagcseréjükhöz nincs szükségük oxigénre, viszont jelenlétét tolerálják, tehát aerotoleráns anaerobok. Nevüket a szénhidrát anyagcseréjük végtermékéről a tejsavról kapták. Az ide tartozó mikrobák tehát nem egy rendszertani kategóriába tartoznak, hanem közös élettani tulajdonságaik miatt kapták ezt a gyűjtőnevet. Tápanyagok szempontjából komplex igényük van (szénhidrátok, aminosavak, peptidek, zsírsav-észterek, sók, nukleinsav-származékok, vitaminok). Szénforrásként glükózt felhasználva lehetnek homofermentatívak (fermentációs termékként több mint 85% tejsavat termelnek) vagy heterofermentatívak (tejsavat, szén-dioxidot, etanolt és/vagy ecetsavat termelnek). Tápanyag igényüket tükrözi előfordulási helyük is: növényeken, növényi eredetű anyagokon, erjesztett vagy romlott ételekben, illetve az állati tápcsatornában (Wood & Holzapfel, 1995).

3.1.2. TEJSAVBAKTÉRIUMOK RENDSZERTANA

A 16S és 23S rRNS szekvencia alapján két nagy ág különíthető el a Gram-pozitív baktériumoknál. A *Clostridium* ág esetében a DNS G+C (guanin+citozin) aránya 50 mol% alatti. A másik ág az actinomycetes ág, ahol a G+C tartalom 50 mol% feletti. A tipikus tejsav baktériumok, mint a *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconosto*, *Pediococcus* és a *Streptococcus* 50 mol% alatti G+C tartalommal rendelkeznek, így a *Clostridium* ághoz tartoznak (1. ábra).



1. ÁBRA GRAM-POZITÍV BAKTÉRIUMOK FILOGENETIKAI TÖRZSFÁJA
(WOOD & HOLZAPFEL, 1995)

Munkám során a *Lactobacillus* nemzetséggel foglalkoztam, így ennek a tulajdonságait a továbbiakban részletesebben szeretném bemutatni.

3.1.3. LACTOBACILLUS NEMZETSÉG

Az ide tartozó baktériumok Gram-pozitív, fakultatív anaerob anyagcserével rendelkező, spórát nem képező, pálcika alakú mikrobák, melyek mozgásra képtelenek. Számos különböző tápanyagra auxotrófok, ezért a legjobban komplex táptalajban fejlődnek. Az optimális növekedési hőmérsékletük 30-40 °C, de akár 50-53 °C-on is képesek növekedni. Optimális növekedési pH-juk 5,5-5,8, de akár 5-nél alacsonyabb pH-n is növekedhetnek. Számos fermentált élelmiszerhez adják hozzá szándékosan indítóanyagként vagy vesznek részt az erjesztésben, mivel a kiindulási szubsztrátok természetes szennyezői, valamint a szájüregben, béltraktusban és a hüvelyben is megtalálhatók a normál mikrobióta részeként (Batt, 2014).

Az utóbbi években a *Lactobacillus*-ok jelentős figyelmet kaptak, mivel potenciálisan részt vesznek az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedésében. A legtöbb *Lactobacillus* belső rezisztenciát mutat az aminoglikozidokkal (gentamicin, kanamicin, sztreptomycin) és

a vankomicinnel szemben, valamint érzékenyek a béta-laktámokra (penicillin, ampiocillin), illetve a fehérjésintézist gátlókra (tetraciklin, eritromicin, klóramfenikol (Elizaveta, és mtsai., 2022)).

3.1.4. TEJSAVBAKTÉRIUMOK ANYAGCSERÉJE

Tejsavbaktériumoknál két eltérő szénhidrát emésztési utat különböztetünk meg, a homofermentatív és a heterofermentatív. Homofermentatív lebontásról beszélünk, ha a végtermék több mint 85%-a tejsav, míg a heterofermentatív anyagcsere során tejsavat, széndioxidot, etanolt és/vagy ecetsavat termelnek. Az állati izomzattal ellentétben a tejsavbaktériumok D (-) vagy L (+) izomert, vagy ezeknek keverékét képezhetik. Ennek a fenotípusos diagnosztikában van jelentősége (Wood & Holzapfel, 1995).

3.2. AZ EMBERI ÉS ÁLLATI BÉLFLÓRA

A tejsavbaktériumok fontosságát az emberi egészség és a hosszú élettartam szempontjából először Metchnikoff vetette fel a század elején. Ő azonban a bélbaktériumokat összességében inkább károsnak, mint jótékonyaknak ítélte. Az emberi bélcsatornában komplex mikro-ökoszisztéma található, mely rendszerről és kölcsönhatásairól még mindig korlátozottak az információink. Ezt a mikrobiális populációt úgy tekinthetjük, mint egy „nyitott ökoszisztémát”, amely mikroba populációk egy csoportját tartalmazza, amelyek egyensúlyban élnek egymással egy térben és időben. Becslések szerint a felnőtt emberi béltraktus körülbelül 10^{14} életképes baktériumot tartalmaz, ami tízszer annyi, mint az emberi test összes szövetében található sejtek száma. Az optimális bélflórával rendelkező ép bélhám gátat jelent a patogén mikroorganizmusok, antigének és káros vegyületek behatolása vagy felvétele ellen (Holzapfel, és mtsai., 1998).

A mikroorganizmusok száma, illetve változatossága nem egyenletes az emésztőrendszerben. Több tényező is befolyásolja, mint például az adott szakaszok tulajdonságai, illetve külső tényezők, mint a stressz, diéta, vagy gyógyszerek fogyasztása/takarmányozása (főleg az antibiotikumok). A szájüreg többé-kevésbé semleges pH-ja után a gyomor alacsony pH-értéke (2,5 és 3,5 között) pusztító a legtöbb mikroba számára. A populáció nagy részét Gram-pozitív baktériumok, például Streptococcusok és Laktobacillusok, valamint élesztőgombák teszik ki. A patkóbélben is viszonylag kicsi a csíraszám, a kedvezőtlen körülmények következtében (gyomorsav, emésztőenzimek, epe), illetve a rövid tartózkodási idő miatt. A

további régiók felé haladva folyamatosan nő a mikrobák száma, és a tejsavbaktériumok mellett megjelennek a Gram-negatív baktériumok is, mint például a *Enterobacterium*, *Bacteroides* és a *Fusobacterium*. Káros mikroorganizmusok is mindig jelen vannak a bélrendszerben, azonban amíg kis számban vannak jelen nem veszélyesek a gazdaszervezetre. A mikroorganizmusok között egymást segítő (szinergista) és egymást gátló (antagonista) kölcsönhatások alakulhatnak ki. A *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajok szerves savak, és más antimikrobás vegyületek kiválasztásával szorítják vissza számos kórokozó szaporodását (Holzapfel, és mtsai., 1998).

A „normál” bélflórára jellemző baktériumok számos jótékony tulajdonsággal rendelkezhetnek, például képesek bizonyos élelmiszer összetevőket lebontani, bizonyos B-vitaminokat termelni, valamint emésztő- és védőenzimeket termelnek. Néhány potenciálisan rákkeltő anyag metabolizmusában is részt vesznek, illetve gyógyszerek hatékonyságában is szerepet játszhatnak. Ezek a hatások lehetnek előnyösek vagy károsak is az egészségre (Holzapfel, és mtsai., 1998).

3.3. TEJSAVBAKTÉRIUMOK MINT PROBIOTIKUMOK

Az egészséges bélrendszer megőrzése kulcsfontosságú minden élőlény számára a táplálékból származó tápanyagok hatékony emésztéséhez és felszívódásához. A kiegyensúlyozott mikrobiota (azaz az egészséges mikro-ökoszisztéma) az egészséges bél elengedhetetlen alkotóeleme. A probiotikumok élő mikroorganizmusok, melyek megfelelő mennyiségben fogyasztva jó hatással vannak a bélrendszer egészségére, a tápanyagok emészthetőségét javítják, ez által a tápanyagok felhasználását is növeli (Liao & Nyachoti, 2017).

Egy törzs kiválasztásánál fontos tényező, hogy bizonyos mikrobiológiai, technológiai és funkcionális kritériumoknak megfeleljen. Kulcsfontosságú, hogy a törzs biztonságos, és genetikailag stabil legyen, valamint jó gyomor- és epesavtűréssel rendelkezzen, meg kell tapadniuk a bélnyálkahártyán, valamint kolonizációs képességgel kell rendelkezniük. Technológiai szempontból fontos, hogy a törzs ne rendelkezzen kellemetlen érzékszervi tulajdonságokkal, illetve életképes maradjon a termék eltarthatósági idejének végéig. A törzsek jelentősen különböznek egymástól ezekben a tulajdonságokban (Holzapfel, és mtsai., 1998).

Különböző probiotikus tulajdonságokkal rendelkező életképes mikroorganizmusokat tartalmazó kiegészítők kaphatók a kereskedelemben akár liofilizált formában, akár fermentált élelmiszer-alapanyagként. A *L. acidophilus* és a *L. casei* törzsek valószínűleg a leghosszabb felhasználási múlttal rendelkeznek az ismert baktériumtörzsek közül az egészségügyi előnyeik miatt (Holzapfel, és mtsai., 1998).

Az élettani és biokémiai mechanizmusok sokszor nem ismertek vagy nem bizonyítottak, hiszen a megfigyelések részben korlátozott számú *in vitro* vizsgálatokból, részben pedig *in vitro* sejtenyészeteken végzett modell kísérletekből származnak (Holzapfel, és mtsai., 1998).

3.4. PREBIOTIKUMOK

A bélcsatorna hasznos mikrobiotájának arányát nem csak a bevitt probiotikus baktériumokkal lehet növelni, hanem a bélrendszerben már jelenlévő baktériumok növekedésének, szaporodásának stimulálásával is, melyre a prebiotikumok alkalmasak. A prebiotikumok az ember számára nem emészthető élelmiszer-összetevők, amelyek jótékony hatással vannak a gazdaszervezetre azáltal, hogy szelektíven stimulálják a vastagbélben jelenlévő egy vagy több jótékony hatású baktériumtörzs növekedését és/vagy aktivitását (Gibson & Roberfroid, 1995).

A prebiotikumok közé tartozik a rezisztens keményítő, a nem-keményítő alapú poliszacharidok (élelmiszer rostok), egyes cukrok és az oligoszacharidok, melyekhez természetes úton is hozzá lehet jutni különböző zöldség- és gyümölcsfélék fogyasztásával (Manning & Gibson, 2004).

3.5. ANTIBIOTIKUMOK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

A mikrobák és metabolitjaik élelmiszerekben, takarmányokban, tejtermékekben, fermentációban, gyógyszeriparban és más területeken történő felhasználása már évszázadok óta folyik. Jótékony szerepük mellett azonban káros hatásai is lehetnek, amik az embereket, állatokat és növényeket fenyegető fertőzések, valamint élelmiszerromlás formájában jelentkeznek. Ezeknek a veszélyforrásoknak a leküzdésére világszerte számos intézkedés folyik, főként az antibiotikumok alkalmazása révén (Sharma, és mtsai., 2018).

Helytelen vagy túlzott alkalmazásuk antibiotikum-rezisztens baktériumok és rezisztencia gének kialakulásához, valamint terjedéséhez vezetett, ami csökkentette terápiás hatékonyságukat (Wright, 2010).

2000-ben a WHO (Egészségügyi Világszervezet) arra jutott, hogy a közegészségügyi legnagyobb globális veszély a növekvő antibiotikum rezisztencia (World Health Organization, 2001).

Az antibiotikumok olyan mikroorganizmusok által termelt másodlagos anyagcseretermékek, melyek más mikrobák életfolyamatait gátolják, viszont megfelelő koncentrációban az emberi szervezet károsodás nélkül elviseli őket. Gyakran kedvezőtlen környezeti hatásra indul be a termelésük, ilyen például a többszörös tápanyag limit, az eltolt pH, illetve a kellemetlen anyagcseretermékek felhalmozódása (Pécs, 2009).

Körülbelül 12-13000 antibiotikumot írtak le, melyek közül nagyjából 300-at alkalmaznak humán gyógyászatban. A klinikai gyakorlatban alkalmazott antibiotikumok többsége néhány évtized után elavult, vagy kikerült az alkalmazási körből. Ennek oka lehet a terjedő rezisztencia, a mellékhatások, allergia fellépése, vagy olcsóbb, hatékonyabb, esetleg könnyebben alkalmazható szerek megjelenése (Pécs, 2009).

3.6. ANTIBIOTIKUMOK CSOPORTOSÍTÁSA

Az antibiotikumokat lehet csoportosítani kémiai szerkezet, hatásmechanizmus, támadáspont, hatásspektrum, bioszintézis út vagy akár orvosi alkalmazás szerint is. Kémiai szerkezet szerint megkülönböztetünk aminosavszármazékokat, ilyen például a cikloszerin vagy a béta-laktám. Szénhidrát származékokat (sztreptomycin, vankomicin), aromásokat, szteránvázasokat stb. A bioszintézisük útja kapcsolódik a kémiai szerkezethez, hiszen hasonló szerkezetű molekulák hasonló anyagcsere-folyamatok során jönnek létre. Hatásmechanizmus vagy támadáspont szerint is lehet csoportosítani őket, mivel a mikrobák életműködését többféle módon is akadályozhatják. Gyakori támadáspont a sejtfalszintézis, a fehérjészintézis és a sejtmembránok működésének gátlása. Az orvosok szempontjából a szerek hatásspektruma, azaz hogy mely mikrobák ellen hatásosak, valamint a terápiás alkalmazhatóság a fő szempont (Pécs, 2009).

3.7. ANTIBIOTIKUMOK HATÁSMECHANIZMUSA

Az antibiotikumok csoportosíthatóak az szerint, hogy sejthalált idéznek-e elő (baktericidek) vagy pusztán gátolják a baktériumsejt növekedését, osztódását (bakteriosztatikus). Hatásmechanizmus szerint lehetnek fehérje-, sejtfal-, nukleinsav-szintézist gátlók, DNS felcsavarodást gátlók, valamint károsíthatják a baktérium DNS-ét is (Kohanski, és mtsai., 2010).

A fluorokinolonok közé tartozik a nalidixinsav, a ciprofloxacín, a levofloxacin és a gemifloxacin. A kinolonok elsődleges célpontja Gram-pozitív baktériumok esetében a topoizomeráz IV., míg Gram-negatív baktériumoknál a topoizomeráz II. A kinolon-topoizomeráz-DNS komplex képződése következtében a blokkolt replikációs villánál a DNS-replikáció leáll, ami bakteriosztatikus hatású, majd végül a sejt halálához is vezet. Ez a gátlás azonban visszafordítható. Az RNS-szintézis gátlása a félszintetikus rifampicineknél hasonló a kinolonok általi gátláshoz. A DNS függő transzkripciót gátolják az által, hogy stabilan és nagy affinitással kötődnek a DNS-hez kötött és aktívan átíró RNS-polimerázhoz (Kohanski, és mtsai., 2010).

A sejtfal által biztosított mechanikai szilárdság rendkívül fontos a baktérium sejt számára, hogy a különböző környezeti tényezőknek ellen tudjon állni. A sejtfalszintézis-gátló antibiotikumok megváltoztatják a sejt alakját, méretét, és végső soron a sejt lízisét eredményezik. A béta-laktám antibiotikumok a sejtfalat felépítő peptidoglikánokban a kötések kialakulását gátolják. A kötést kialakító transzpeptidáz enzim aktív centrumába köt a peptidoglikán analógjaként (Kohanski, és mtsai., 2010).

A fehérjeszintézist gátló antibiotikumok két alosztályra oszthatók: Az egyik a 50S riboszóma alegységet gátolja, míg a másik az 30S alegységet. Az 50S riboszóma inhibitorok közé tartozik például az eritromicin és a klóramfenikol. Úgy fejtik ki hatásukat, hogy fizikailag blokkolják a fehérje transzláció beindulását (lánckezdés) vagy a keletkező fehérje lánc folytatását. A 30S riboszóma inhibitorok közé tartoznak a tetraciklinek és az aminociklitolok, utóbbiak közé tartoznak a spektinomycin és az aminoglikozidok. A tetraciklinek úgy fejtik ki hatásukat, hogy blokkolják az aminoacil-tRNS hozzáférését a riboszómához, hatásuk visszafordítható, így csupán bakteriosztatikusak. Az aminoglikozidok megváltoztatják az mRNS kodon és az ahhoz kapcsolódó aminoacil-tRNS által létrehozott komplex konformációját. Ez a konformáció-változás hibás kodon-antikodon párosodást okoz, ezáltal a genetikai kód hibásan fordítódik le, ami hibás fehérjék szintézisét eredményezi. Ez a folyamat nem visszafordítható és a sejt halálát okozza, tehát baktericid hatású (Kohanski, és mtsai., 2010).

3.8. VIZSGÁLATAIM SORÁN HASZNÁLT ANTIMIKROBÁS SZEREK

Ampicillin

Az ampicillin egy félszintetikus penicillin (béta-laktám antibiotikum) származék, mely főként Gram-pozitív baktériumokra hatásos, azonban egyes Gram-negatív szervezetek

membránján is képes átjutni. Gátolja a sejtfal szintézisét azáltal, hogy a penicillin-kötő fehérjékhez kapcsolódva inaktiválja a peptidázokat, ami sejtlízishez vezet. Felső és alsó légúti fertőzések, bőr- és bőrszerkezeti fertőzések, húgyúti fertőzések és középfülgyulladás kezelésére használják az egészségügyben (Castle, 2007).

Sztreptomycin

A sztreptomycin az aminoglikozidok csoportjába tartozik, a riboszómák 30S alegységéhez kötődik és konformáció változást okoz. Ez a konformáció változás a genetikai kód hibás lefordítását okozza, ami hibás fehérjék szintézisét eredményezi. Könnyen átdiffundál a baktériumok külső membránján. Széles spektrumú antibakteriális hatással rendelkezik. A legtöbb Gram-negatív és néhány Gram-pozitív baktériummal szemben is hatásos. Különböző húgyúti fertőzésekre és gyomorfertőzésekre alkalmazzák (Vardanyan & Hrudy, 2006).

Kanamycin

A kanamicin szintén az aminoglikozidok csoportjába tartozik, széles spektrumú antimikrobiális hatással rendelkezik. Hatásos a legtöbb Gram-pozitív és Gram-negatív mikroorganizmussal szemben. Támadáspontja a fehérjeszintézis gátlása a 30S riboszómán. Agyhártyagyulladás, tüdőgyulladás, elfertőződött sebek, valamint műtétek utáni gennyes szövődmények kezelésére használják (Vardanyan & Hrudy, 2006).

Eritromicin

Az eritromicin gátolja a bakteriális fehérjeszintézist azáltal, hogy reverzibilisen kötődik az 50S riboszómális alegységükhöz, így gátolja az új peptidkötések kialakulását. A bakteriosztatikus antibiotikumok közé sorolják, azonban néhány mikrobával szemben baktericid hatást is kifejthet a megfelelő koncentrációban. Főként Gram-pozitív de néhány Gram-negatív mikroorganizmus ellen is hatásos. Olyan bakteriális fertőzésekre használják, mint például a szamárköhögés, mandulagyulladás, epehólyag gyulladás és a tüdőgyulladás (Vardanyan & Hrudy, 2006).

Klóramfenikol

A klóramfenikol gátolja a fehérjeszintézist a baktériumokban, valamint kis mértékben az eukarióta sejtekben. Könnyen diffundál a baktériumsejtbe, ahol reverzibilisen kötődik az 50S riboszómális alegységhez. Széles spektrumú antimikrobiális aktivitással rendelkezik, beleértve a Gram-pozitív, Gram-negatív, aerob és az anaerob baktériumokat is. A klóramfenikollal szembeni rezisztenciát egy olyan plazmid jelenlétével magyarázzák, amely

meghatározza a klóramfenikol-acetiltranszferáz termelését. A klóramfenikol potenciálisan mérgező gyógyszer, néhány javallat van a használatára, például a tífusz vagy az agytályogok kezelése. Számos fertőzés hatékony alternatívája olyan helyzetekben, amikor a választott gyógyszerek valamilyen okból nem alkalmazhatók, azonban sosem használható olyan fertőzések esetén, amelyek más antimikrobiális gyógyszerekkel könnyen kezelhetők (Vardanyan & Hrudý, 2006).

3.9. ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA MEGSZERZÉSE

A mikroorganizmusok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája lehet természetes vagy szerzett. A természetes rezisztencia állandó, örökletes tulajdonság, mely fajokra vagy nagyobb rendszertani egységekre jellemző. A szerzett antibiotikum-rezisztencia a természetes érzékenységi spektrum örökletes megváltozása egy generáción belül (Barcs, 2009).

Természetes védelem esetén az adott fajnak vagy törzsnek az alapvető felépítése vagy funkcionális sajátossága miatt hatástalan az adott antibiotikum. Egyes Gram-negatív baktériumok számos vegyülettel szembeni természetes rezisztenciája abból adódik, hogy ezek a szerek nem képesek átjutni a külső membránjukon. Ilyenre példa a vankomicin, ami a peptidoglikánok közötti kötések létrejöttét gátolja, azonban csak a Gram-pozitív baktériumok esetében hatásos (Blair, és mtsai., 2014).

Szerzett rezisztenciáról akkor beszélünk, ha a természetes rezisztenciával nem rendelkező baktérium mutáció vagy genetikai anyag átvitele révén szerez rezisztencia-mechanizmust kódoló géneket más, azonos vagy eltérő fajba tartozó baktériumoktól. A rezisztencia géneket általában mobilis genetikai elemek hordozzák, amik lehetnek plazmidok (kromozómától független, cirkuláris kettős szálú DNS) vagy transzpozonok (DNS mobilis szekvenciái, melyek a genomon belül képesek változtatni a helyüket). Az átvitel többféle módon történhet: konjugációval (közvetlen sejt-sejt közötti transzfer), transzdukcióval (bakteriális DNS átvitele bakteriofággal) és transzformációval (DNS felvétele környezetből). (MacGowan & Macnaughton, 2017).

3.10. SZERZETT ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA MECHANIZMUSAI

A szerzett antibiotikum rezisztenciát számos mechanizmus közvetítheti, amelyeket három fő csoportba sorolhatunk. Az első (I) mechanizmus minimalizálja az antibiotikum intracelluláris koncentrációját. A második (II) az antibiotikumot a támadáspontjának

megváltoztatásán keresztül teszi hatástalanná. A harmadik (III) védekezési lehetőség, hogy a hatóanyag elbontásával inaktíválják az antibiotikumot (Blair, és mtsai., 2014).

- I. A Gram-negatív fajokra jellemző külső membrán permeábilis gátat képez a sejt körül, mely meggátolja az antibiotikum sejtbe jutását. Ennek a külső membránnak fontos szerepe van a sejtek védelmében, ugyanakkor a sejt életfunkcióihoz szükséges anyagok átjárását is biztosítani kell, így igen összetett a felépítése. Ez az erősen hidrofób lipid kettős réteg specifikus méretkizárási tulajdonságokkal rendelkező pórusképző fehérjéket tartalmaz, például a porint. A kis méretű hidrofil antibiotikumok ezeken a porin csatornákon keresztül juthatnak be passzív diffúzióval a sejtbe. Ennek megakadályozása két módon lehetséges. Az egyik, hogy a membrán összetétele megváltozik, és a porinok száma nagy mértékben lecsökken, vagy teljesen el is tűnnek. A másik, hogy a porinok funkciója változik meg egy mutáció által (Delcour, 2009). Az efflux pumpák olyan transzport fehérjék, melyek számos antibiotikumot aktívan (energiaigényes) pumpálnak ki a sejtől. Ezek a pumpák lehetnek specifikusak is egy szubsztrátra vagy kijuttathatnak strukturálisan teljesen eltérő szubsztrátokat is (Blair, és mtsai., 2014).
- II. A legtöbb antibiotikum specifikusan, nagy affinitással kötődik a célpontjához a sejtben, így megakadályozva annak normális aktivitását. A célpont egy vagy több genomi mutációja olyan strukturális változásokat okozhat, melyek megakadályozzák az antibiotikum hatékony kötődését, de továbbra is lehetővé teszik a célfehérje normál aktivitását, nagymértékű rezisztenciát biztosítva (Blair, és mtsai., 2014).
- III. Amellett, hogy megakadályozhatják az antibiotikum bejutását a sejtbe vagy megváltoztathatják a célpontjaikat, a baktériumok el is pusztíthatják vagy módosíthatják az antibiotikumokat. Az antibiotikumok enzimkatalizált módosítása az antibiotikum-rezisztencia egyik fő mechanizmusa. Ennek klasszikus esete a penicillin típusú antibiotikumok béta-laktám gyűrűjének hidrolitikus hasítása a rezisztens baktérium által termelt béta-laktamáz enzimmel. Az antibiotikumok inaktíválásának másik módja, hogy valamilyen kémiai csoport (pl.: acil, foszfát, adenil) kapcsolódik az antibiotikumhoz, ami így képtelen, vagy kisebb affinitással képes kötődni a célfehérjéhez (Blair, és mtsai., 2014).

3.11. ANTIBIOTIKUMOK TAKARMÁNYKÉNT TÖRTÉNŐ FELHASZNÁLÁSÁNAK PROBLÉMÁI

Egyes antibiotikumok a haszonállatokra nézve, nem megfelelő mennyiségben vagy ideig alkalmazva akár toxikusak is lehetnek. Az antibiotikumok emberi fogyasztásra szánt állati részekben is felhalmozódhatnak, így jelentős élelmiszerbiztonsági kockázatot jelentenek. Nem megfelelő dózisban vagy ideig történő adagolásának egyik nem kívánt hatása a bélrendszerben található hasznos mikrobák számának a csökkenése, ami a tápanyagok emésztésének romlására, illetve potenciálisan patogén fajok elszaporodására teremt lehetőséget. A másik nem kívánt hatás a rezisztencia, illetve keresztrezisztencia kialakulása. Ennek a problémának a kialakulásához nem feltétlen szükséges túl nagy mennyiség alkalmazása, elég csupán kis mennyiség alkalmazása is hosszú időn keresztül. A rezisztencia kialakulása két szempontból is gondot jelent. Egyrészt, ha a takarmányozott állatokban rezisztens patogén törzsek jelennek meg, akkor nem vagy nem kellő-képpen reagál a célzott antibiotikum terápiára. Másrészt ezek a rezisztens törzsek a környezetbe kerülve vagy állati termékek fogyasztásával akár az ember egészségére is veszélyesek lehetnek (Mézes & Kulcsár, 2019).

A takarmány-adalékanyagként alkalmazott baktériumok nem bővíthetik az antibiotikum rezisztencia gének készletét a bélben jelenlévő baktérium populációban. Emberi és állati felhasználás szempontjából releváns antimikrobiális szereket kell figyelembe venni. A takarmányokban alkalmazható tejsavbaktérium fajokra az EFSA (Európai Élelmiszer Bizottság) meghatározta az antibiotikum határértékeket mg/L koncentrációban (Rychen, és mtsai., 2018).

3.12. BÜRKER-KAMRÁS SEJTSZÁMLÁLÁS

Meghatározott folyadék térfogatban szuszpendált mikrobák meghatározására számláló kamrákat szoktak használni. Ezek olyan tárgylemezek, melyekre négyzethálósan csatornákat marnak, melyekben a lefedett folyadékoszlop magassága ismert. A négyzetháló osztásainak mérete is ismert, így pontos térfogatot kapunk a fedőlemez és a tárgylemez között. Az általam is használt Bürker-kamra (2. ábra) esetében a mintaterek magassága 0,1 mm, a nagy négyzet mérete $1/25 \text{ mm}^2$, a kis négyzet pedig $1/400 \text{ mm}^2$. A faktor érték kiszámításánál meghatározzuk, hogy az egy négyzethez tartozó folyadéktérfogat hányad része az 1 mililiternek:

Nagy négyzet esetén:

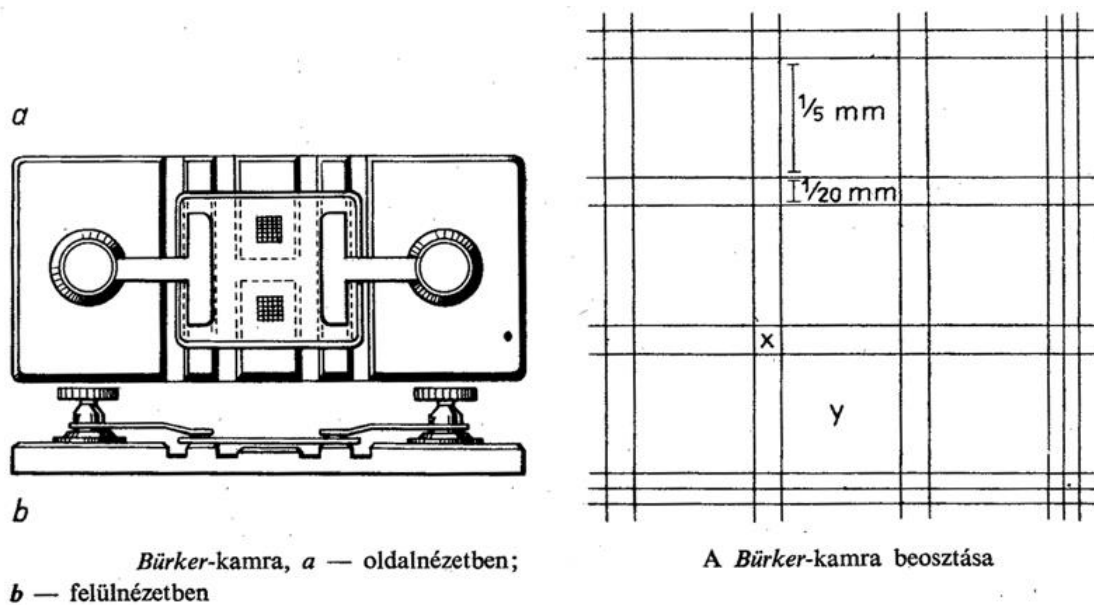
$$V = 0,2 \times 0,2 \times 0,1 = 0,004 \text{ mm}^3$$

$$f = 1000 \text{ mm}^3 / 0,004 \text{ mm}^3 = 2,5 \times 10^5$$

Kis négyzet esetén:

$$V = 0,05 \times 0,05 \times 0,1 = 0,00025 \text{ mm}^3$$

$$f = 1000 \text{ mm}^3 / 0,00025 \text{ mm}^3 = 4 \times 10^6$$



2. ÁBRA BÜRKER-KAMRA FELÉPÍTÉSE (INTERNET 1)

A megszámlálendő négyzeteket véletlenszerűen az egész számlálókamra felületéről választjuk. Ha van/vannak olyan sejtek, melyek a kamra határvonalán helyezkednek el, akkor célszerű a felső és a jobb oldali határvonalon elhelyezkedő sejteket beleszámítani, míg a bal oldali és alsó vonalon lévő sejteket kihagyni a számlálásból (Kunglné Nagy, 2013).

3.13. KORONGDIFFÚZIÓ

A korongdiffúziós módszer az egyik legrugalmasabb érzékenységi vizsgálati módszer a vizsgálható antimikrobiális szerek tekintetében. Rugalmassága és gyorsasága miatt széleskörűen használják. A módszer abból áll, hogy antimikrobiális szerekkel átitatott papírkorongokat helyezünk el a tesztbaktériummal előzőleg szélesztett agarra, majd inkubáljuk. Az antibiotikum az agarba diffundál, és inkubálás után megfigyeljük a gátlási zóna jelenlétét, ahol az antibiotikum gátolta a mikroba növekedését, illetve miliméterben lemérjük annak nagyságát (Tenover, 2015).

3.14. ABSZORBANCIA MÉRÉS

A spektrofotometria gyakran használt analitikai eljárás, alkalmas kis mennyiségű anyagok gyors, egyszerű és rutinszerű mérésére. A spektrofotométer abszorbancia mérésére alkalmas műszer, amely egy általunk meghatározott hullámhosszúságú fényt állít elő, majd a mintára irányítja és méri az átjutó fénysugár intenzitását. A minta által elnyelt fényt a beeső és az áteresztett fényintenzitás hányadosával jellemezzük. A fényelnyelés nagyságából az abszorbeáló komponens koncentrációjára lehet következtetni, esetünkben a sejtek koncentrációjára. Minél magasabb a sejtek koncentrációja a szuszpenzióban, annál nagyobb a fényelnyelése, tehát az abszorbancia értéke is. Ezt a fényáteresztő képesség változást akár szabad szemmel is meg lehet figyelni az inkubációs idő letelte után (Hegyi, és mtsai., 2003).

Borosi Bernadett Szakdolgozat

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. ALKALMAZOTT TÁPTALAJOK

MRS (De Man, Rogosa, Sharpe Broth, VWR) táplevest használtam munkám során, mely szelektív a tejsavbaktériumokra. Mivel ez egy por állagú tápleves, desztillált vízben kellett feloldanom. 1 liter tápleves elkészítéséhez 55,2 g por szükséges. Az MRS tápleves összetételét az 1. táblázat tartalmazza.

1. TÁBLÁZAT: MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARPE BROTH) TÁPLEVES ÖSSZETÉTELE

Összetevő neve	Mennyiség (g/L)
Enzimatisan emésztett kazein	10,00
Hús kivonat	10,00
Élesztő kivonat	4,00
Glükóz	20,00
Dikálium-hidrogén-foszfát	2,00
Nátrium-acetát	5,00
Ammónium-citrát	2,00
Magnézium-szulfát	0,20
Mangán-szulfát	0,05
Polioxietilén(20)-szorbitán-oleát (Tween 80)	1,08

A korongdiffúziós vizsgálathoz szükségem volt tápagarra, melynek felületére kiszéleszthetem a mikroba szuszpenziókat. Ehhez szintén az MRS por állagú táplevest használtam, melynek összetételét a fentebb levő táblázat tartalmazza, annyi különbséggel, hogy a szilárdulás érdekében agart adtam hozzá. Fél liter tápagarra volt szükségem, mely elkészítéséhez 27,6 g port és 9g agart (Bacteriological Agar, VWR) oldottam fel desztillált vízben. Autoklávban steriliztem 121 °C-on, 1,1 bár nyomáson, 15 percig. Dermedés előtt petri-csészékbe öntöttem szét a táptalajt, majd hagytam kihűlni.

A mikrobaszuszpenziók abszorbancia méréses vizsgálatához peptonvizet használtam hígítószerként, mely összetevői a 2. táblázatban láthatóak. A peptonvíz egy nem szelektív közeg, melyet elsősorban hígítószerként használnak izotóniás tulajdonsága miatt.

2. TÁBLÁZAT: PEPTONVÍZ ÖSSZETÉTELE

Összetevő neve	Mennyiség
Pepton	1 g
Nátrium-klorid	9 g
Desztillált víz	1 L

4.2. VIZSGÁLT TÖRZSEK

Munkám során a MATE Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoportja által izolált törzseket használtam. 16 törzset vizsgáltam, melyek mindegyike a *Lactobacillus paracasei* fajhoz tartozott. A -20 °C-on glicerolban tárolt törzsekből kioldás után 100 µL-t pipettáztam 9 mL MRS tápvelesbe, majd 48 órán át 37 °C-on inkubáltam. Az így kapott friss tenyészeteket használtam a munkám során.

4.3. BÜRKER-KAMRÁS SEJTSZÁMLÁLÁS

A tenyészeteket vortexeltem, majd 10x-es hígítást készítettem, hogy könnyebb legyen a számolás, így a kapott értékeket 10 -zel kell szorozni a számolás végén.

A tárgylemezre rászorítottam a fedőlemezt.

A szuszpenzióból vortexelés után a fedőlemez mellé pipettáztam, ami a kapilláris erők hatására felszívódik a fedőlemez alá.

40x-es nagyítású objektívvel vizsgáltam a mintákat.

Mintánként 10-10 kis négyzetet számoltam le, majd ezeknek az átlagából számítottam ki mililiterenkénti sejtszámot, majd a korábbi hígítási lépés miatt 10-zel szoroztam a kapott átlag értéket.

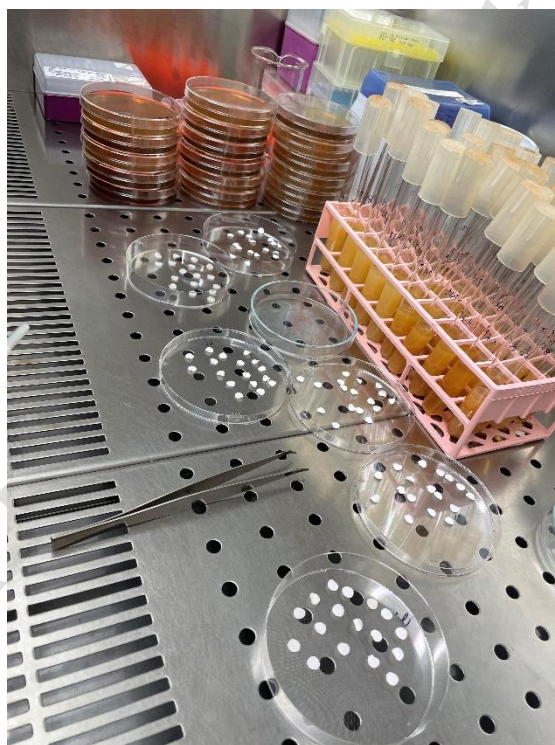
4.4. KORONGDIFFÚZIÓ

Szűrőpapírból lyukasztó segítségével 6 mm átmérőjű korongokat lyukasztottam (3. ábra), amiket autoklávban lesterileztem, majd az EFSA által meghatározott koncentrációjú antibiotikumokból 8 µL-t (ekkora mennyiséget volt képes felszívni a szűrőpapír) pipettáztam rájuk. Ezek a koncentrációk a 3. táblázatban láthatóak.

3. TÁBLÁZAT: *L. PARACASEI* ANTIBIOTIKUM HATÁRÉRTÉKEI MG/L-BEN MEGADVA

	Ampicillin	Kanamicin	Streptomicin	Eritromicin	Klóramfenikol
<i>L. paracasei</i>	4	64	64	1	4

Minden vizsgált törzset MRS tápagarra 2-2 petri-csészére kiszélesztettem, majd a lemezeket 3 részre osztottam. A köröcikkre előre felírtam az alkalmazott antibiotikum kezdőbetűjét, majd lamináris box alatt ráhelyeztem az antibiotikummal átítatott korongokat az agar felületére ügyelve rá, hogy a korong teljes felülete érintkezzen az agarral. Fontos, hogy a korongokat utólag ne mozgassuk, mert a diffúzió azonnal megkezdődik, ami az eredményeket befolyásolhatja. 48 órán át 37 °C-on inkubáltam, majd megfigyeltem a gátlási zóna jelenlétét/hiányát, amit lemértem mm-ben.



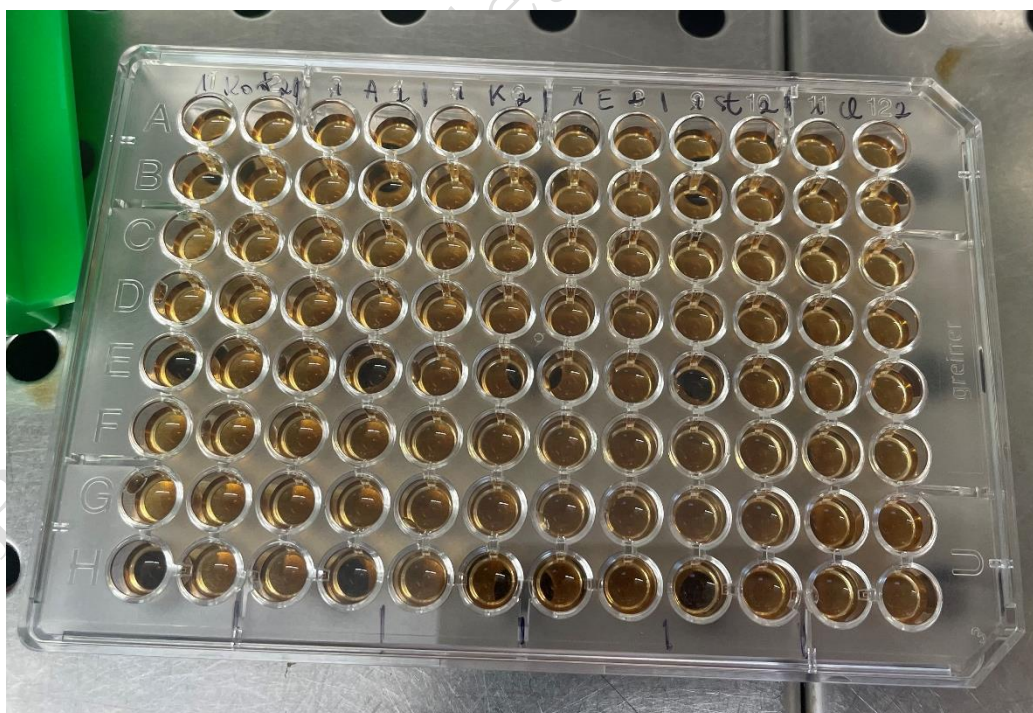
3. ÁBRA: ANTIBIOTIKUMMAL ÁTÍTATOTT KORONGOK KÉSZÍTÉSE HÁZILAG LAMINÁRIS BOX ALATT

4.5. ABSZORBANCIA MÉRÉS

Munkám során a FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader-t használtam, melybe egyszerre több minta is vizsgálható, esetemben egy 96-os plate-et töltöttem fel a mintákkal (4. ábra), melyek elhelyezését a 4. táblázat tartalmazza.

4. TÁBLÁZAT MINTÁK ELHELYEZKEDÉSE A PLATE-EN

	Kontroll		Ampicillin		Kanamicin		Eritromicin		Sztreptomycin		Klóramfenikol	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MA6	MA7	MA6	MA7	MA6	MA7	MA6	MA7	MA6	MA7	MA6	MA7
B	MA9	MA26	MA9	MA26	MA9	MA26	MA9	MA26	MA9	MA26	MA9	MA26
C	MA27	MA31	MA27	MA31	MA27	MA31	MA27	MA31	MA27	MA31	MA27	MA31
D	MA32	MA33	MA32	MA33	MA32	MA33	MA32	MA33	MA32	MA33	MA32	MA33
E	MA34	MA35	MA34	MA35	MA34	MA35	MA34	MA35	MA34	MA35	MA34	MA35
F	MA36	MA37	MA36	MA37	MA36	MA37	MA36	MA37	MA36	MA37	MA36	MA37
G	MA42	MA43	MA42	MA43	MA42	MA43	MA42	MA43	MA42	MA43	MA42	MA43
H	MA44	MA46	MA44	MA46	MA44	MA46	MA44	MA46	MA44	MA46	MA44	MA46



4. ÁBRA: AZ ABSZORBANCIA MÉRÉSHEZ HASZNÁLT PLATE. A MINTÁK KIOSZTÁSA A 4. TÁBLÁZATBAN LÁTHATÓ

A plate első két oszlopába 135 µl MRS táplevest, valamint a vizsgált törzsek 100x-os hígításából 15 µl -t pipettáztam. Ebbe a két oszlopba nem került antibiotikum, így ezek adják az úgynevezett pozitív kontroll értékeit, melyhez tudtam viszonyítani, hogy az adott antibiotikum hatással volt-e a növekedésre. A plate többi oszlopa az EFSA által meghatározott antibiotikum koncentrációkat tartalmazta.

A 48 órás 37 °C-on történő inkubálás után 620 nm-en mértem a minták abszorbanciáját.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. BÜRKER-KAMRÁS SEJTSZÁMLÁLÁS

Ahogy az Anyagok és Módszerek részben is említettem, a sejtek felszaporodása akár szabad szemmel is látható. Az inkubációs idő letelte után a friss tenyészetek kémcsöveit összehasonlítottam egy olyan kémcsővel, amiben csupán az MRS tápleves volt. Szabad szemmel is jól érzékelhető volt, a táplevesek zavarosodása, tehát a fényáteresztő képességük csökkent. Ebből arra lehetett következtetni, hogy minden törzs felszaporodott, amit a mikroszkóp alatti vizsgálat is igazolt.

Mintánként 10-10 kis négyzetben található sejtet számoltam le, majd ezeknek vettem az átlagát. A milliliterenkénti telepkepző egységet az Anyagok és Módszerek részben leírtak szerint számoltam ki. A sejtkoncentrációkat az 5. táblázat tartalmazza.

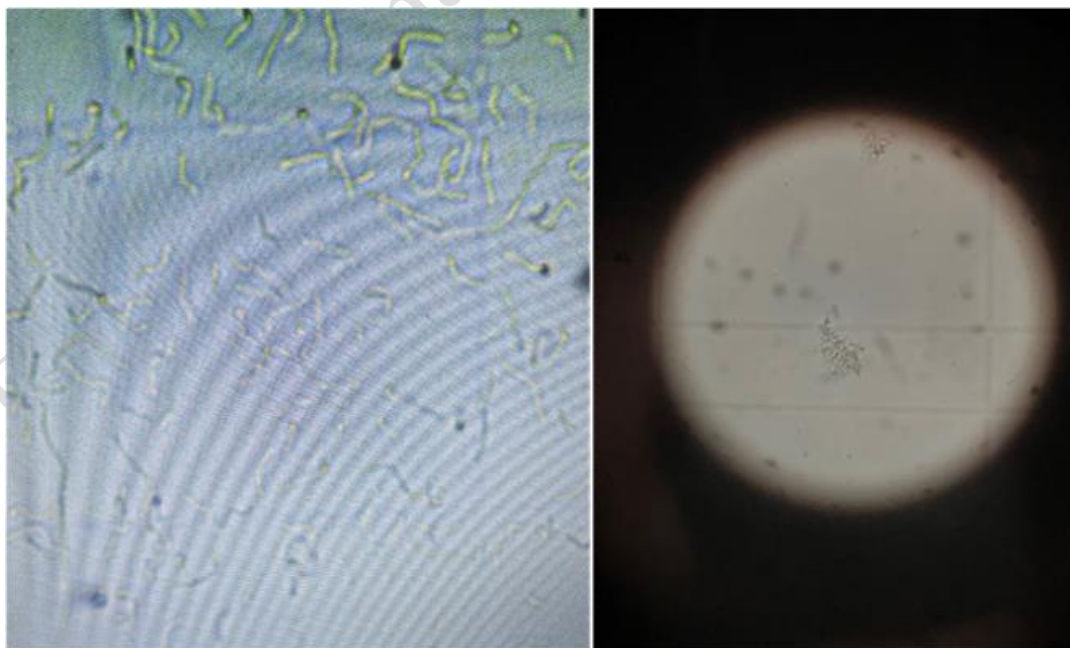
5. TÁBLÁZAT: A VIZSGÁLT TÖRZSEK SEJTKONCENTRÁCIÓJA BÜRKER-KAMRÁS SEJTSZÁMLÁLÁSSAL

Vizsgált törzsek	sejt átlag	sejt/mL
MA6	14,5	5,8*10 ⁸
MA7	14,8	5,92*10 ⁸
MA9	14,9	5,96*10 ⁸
MA26	8,1	3,24*10 ⁸
MA27	12,8	5,12*10 ⁸
MA31	26,6	1,06*10 ⁹
MA32	16,6	6,64*10 ⁸
MA33	11,7	4,68*10 ⁸
MA34	27,1	1,08*10 ⁹
MA35	18,8	7,52*10 ⁸
MA36	37,1	1,48*10 ⁹

MA37	23,3	9,32*10 ⁸
MA42	19,4	7,76*10 ⁸
MA43	csomós, nem számolható	-
MA44	39,2	1,57*10 ⁹
MA46	24,6	9,84*10 ⁸

A *Lactobacillus paracasei* törzsek viszonylag egységesen szaporodtak adott körülmények között, a legkisebb sejtkoncentráció $3,24 \cdot 10^8$ és a legnagyobb $1,57 \cdot 10^9$ sejt/mL volt. A különbség az egy nagyságrendet sem érte el.

Az MA43 törzs esetében a mikroszkópban sejtsomókat lehetett látni (5. ábra), így ezeknek a négyzeteknek a leszámolása nem volt lehetséges. Ennek több magyarázata is lehet. Okozhatta a túl magas sejtkoncentráció vagy a nem megfelelő/nem elég ideig tartó vortexelés. Másik magyarázat lehet az, hogy a törzs biofilmképző tulajdonsággal rendelkezik, pl.: extracelluláris poliszacharidokat képes termelni, ami elősegítette a sejtek összeállását a táplevesben. Ugyan ez a tulajdonság nem kifejezetten jellemző a faj törzseire, de Tang és munkatársai (2021) leírtak egy *L. paracasei* törzset, amelynél megfigyelték ezt a képességet. *Lactobacillus* nemzetség esetében nem szokványos módon ez a törzs fertőző endokarditist is okozott egy betegnél.



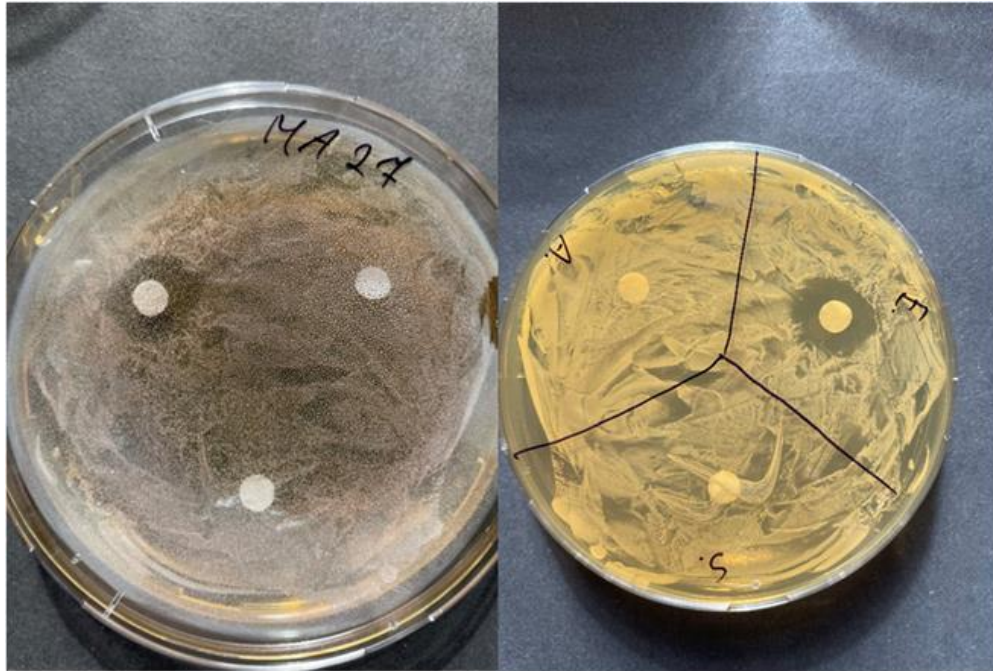
5. ÁBRA: BAL OLDALT A BÜRKER-KAMRA KIS NÉGYZETÉBEN JÓL LÁTHATÓ ÉS ELKÜLÖNÜLT TELEPKÉPZŐ EGYSÉGEK, MÍG JOBB OLDALT AZ MA43 TÖRZS ÖSSZEÁLLT SEJTJEI LÁTHATÓAK

5.2. KORONGDIFFÚZIÓ

A vizsgált törzsek mindegyike kinőtt a tápagon 37 °C -on 48 órán át történő inkubálás után. Gátlási zónát egyedül az eritromicin esetében lehetett megfigyelni (6. ábra). Ezeknek a mm-ben lemért átmérőit a 6. táblázat tartalmazza.

6. TÁBLÁZAT: A VIZSGÁLT TÖRZSEK GÁTLÁSI ZÓNÁI MM-BEN MEGADVA ERITROMICIN ESETÉBEN

	Eritromicin feltisztulási zóna (mm)
MA6	13,1
MA7	14
MA9	17,7
MA26	11,2
MA27	16,2
MA31	11
MA32	12,3
MA33	16,7
MA34	10,7
MA35	18,1
MA36	14,1
MA37	11,9
MA42	8,4
MA43	11,4
MA44	12
MA46	13,6



6. ÁBRA: MA27 TÖRZS ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIÁJÁNAK VIZSGÁLATA KORONGDIFFÚZIÓS MÓDSZERREL. ERITROMICINRE JÓL LÁTHATÓ GÁTLÁSI ZÓNA JELENT MEG, MÍG AZ AMPICILLIN ÉS A SZTREPDOMICIN ESETÉBEN NEM LEHET GÁTLÁSI ZÓNÁT LÁTNI

Ezekből az eredményekből az következik, hogy az összes vizsgált törzs érzékeny az eritromicinre, ami a későbbiekben az abszorbancia vizsgálatnál igaznak is bizonyult.

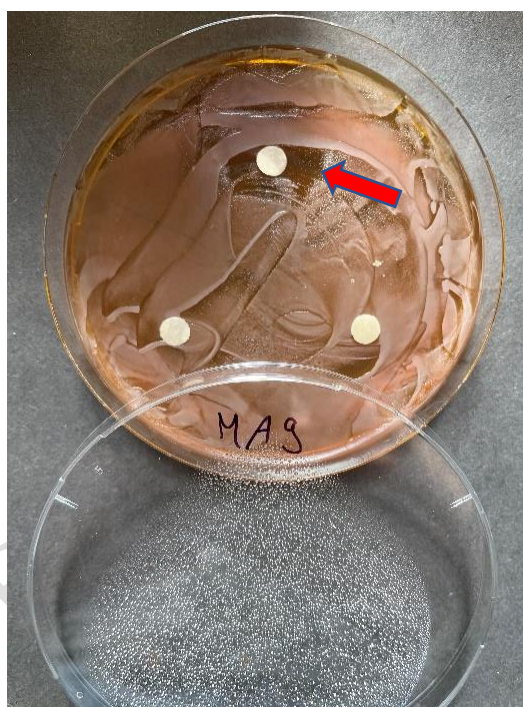
A többi antibiotikumnál nem lehetett megfigyelni gátlási zónát, ami arra utal, hogy rezisztensek az antibiotikumokra. Ez nem valószínű, és az abszorbancia mérésnél be is bizonyosodott, hogy nem rezisztensek a többi antibiotikummal szemben.

Ezek az eredmények következhetnek abból, hogy házilag készítettem el a korongokat, mivel a laborban nem álltak rendelkezésre gyári korongok. Az volt a céлом, hogy megpróbáljam házilag készített korongokkal vizsgálni az antibiotikum rezisztenciát, hogy a későbbiekben költséghatékonyabbá tehessem így a vizsgálatot, amennyiben a módszer működik. Azonban hiába pipettáztam a megfelelő koncentrációjú antibiotikumból 8 μ l-t a korongokra (ennyi volt a maximális mennyiség, amit a korongok fel tudtak szívni), lehetséges, hogy nem volt elegendő a mikrobák szaporodásának gátlásához.

A vizsgált antibiotikumok közül az eritromicin koncentrációját határozta meg az EFSA a legkisebbnek, azaz 1 mg/L-nek, tehát ez rendelkezik a legerősebb antimikrobiális hatással a vizsgált antibiotikumok közül, amit a korong diffúziós vizsgálat alá is támasztott. Annak,

hogy egyedül az eritromicinnel átitatott korongok körül jelent meg gátlási zóna, ehhez az erős antimikrobiális hatáshoz lehet köze.

Érdemes megemlíteni az M9-es törzs klóramfenikollal átitatott korongra adott reakcióját, mely a 7. ábrán látható. Megfigyelhető, hogy az agar teljes felületén egyenletesen nőttek ki a telepek, kivéve a felső korong körül, ami a klóramfenikollal átitatott szűrőpapír volt. A nyíllal jelzett területen úgy tűnik, hogy gátolva van a mikrobák szaporodása. A módszer működési elvéből adódik, hogy a korongból sugár irányban diffundál az antibiotikum az agarba, így érve el azt a koncentrációt, amin már nem gátolja a törzs szaporodását (érzékeny törzs esetében), tehát a korong körüli a feltisztulási zónának szabályos kör alakúnak kellene lennie. Ebből kifolyólag az eredményt nem vettem figyelembe.



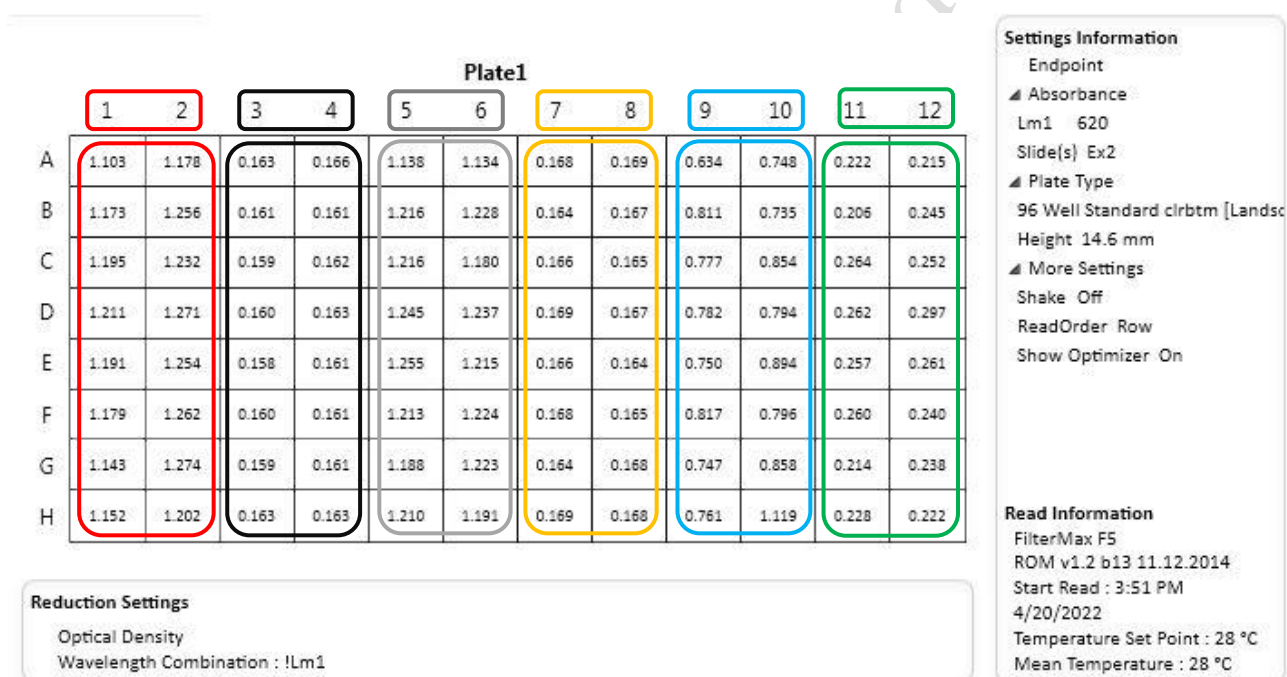
7. ÁBRA: MA9 TÖRZS KLÓRAMFENIKOLRA ADOTT SZABÁLYTALAN ALAKÚ GÁTLÁSI ZÓNÁJA

A korongdiffúziós módszer lényeges hibaforrása az emberi tényező. A gátlási zóna széle nem teljesen egyértelmű, illetve nagyon kis méretekről van szó, így a zóna átmérőjének pontos leolvasása hordoz magában hiba lehetőséget.

5.3. ABSZORBANCIA MÉRÉS

A 16 vizsgált törzs az 5 antibiotikumra és a pozitív kontroll a plate mind a 96 lyukát elfoglalja, így negatív kontrollt, amiben csak az MRS tápleves van, nem vizsgáltam. Ugyanakkor, korábbi kísérleteknél a kutatócsoport már lemérte az MRS tápleves abszorbanciáját, ami 0,1 volt. Negatív kontroll esetében azt várnánk, hogy az eredmények nagyságrendileg kisebbek a pozitív kontrollhoz képest, így ahol az antibiotikumra rezisztens törzsek vannak, ott az eredmények nagyságrendileg a pozitív kontroll értékeivel mutatnak hasonlóságot, míg ahol gátolva vannak a mikrobák, ott nagyságrendileg kisebbek az értékek, a negatív kontroll értékéhez hasonlóan.

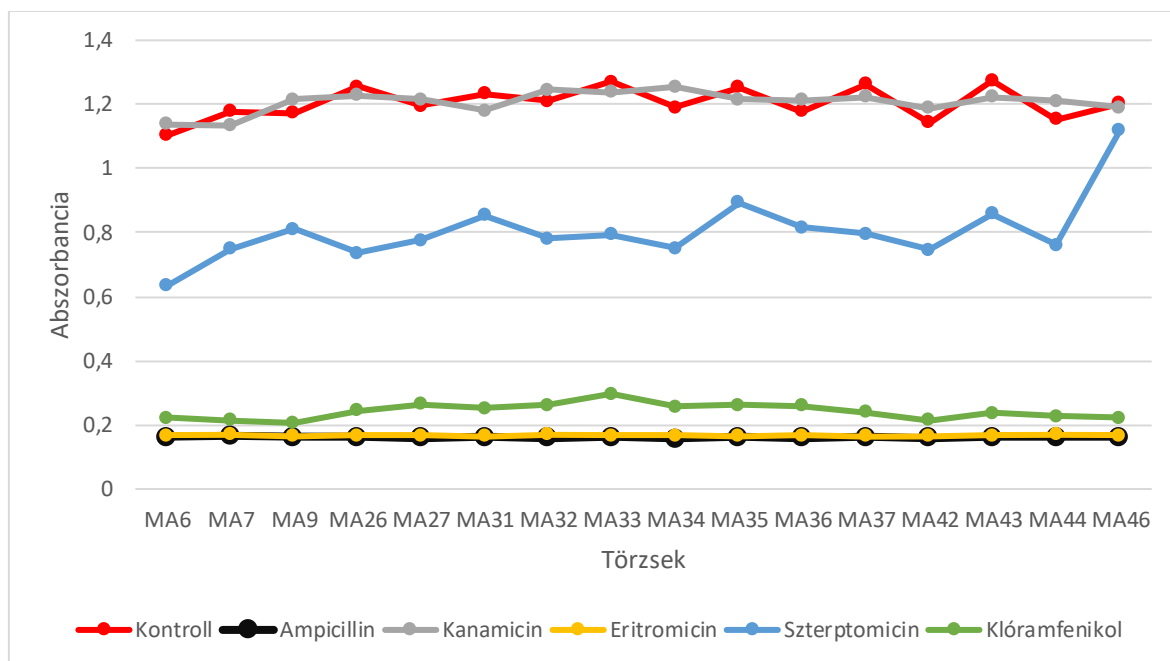
Az abszorbancia mérési eredményei a 8. ábrán láthatók.



8. ÁBRA: AZ ABSZORBANCIA MÉRÉS EREDMÉNYEI. A PLATE-KIOSZTÁSA A 4. TÁBLÁZATBAN LÁTHATÓ. A 9. ÁBRÁN HASZNÁLT SZÍNEKKEL JELÖLTÉM AZ ANTIBIOTIKUMOKAT

Az ábrán is jól látható, hogy az első két oszlopban a pozitív kontrollok értékei nagyságrendileg azonosak, és igen kis különbségek vannak közöttük, tehát mindegyikben felszaporodtak a törzsek, így minden törzs antibiotikumra adott reakcióját tudtam a pozitív kontrollhoz hasonlítani.

Ahhoz, hogy az eredmények könnyebben átláthatóak és értelmezhetőek legyenek, egy diagram segítségével szemléltettem a kapott abszorbancia értékeket, valamint a diagramon használt színekkel jelöltem melyik oszlopban melyik antibiotikum van (9. ábra).



9. ÁBRA: TÖRZSEK ANTIBIOTIKUMOKRA ADOTT ABSZORBANCIA ÉRTÉKEI VONALDIAGRAMON ÁBRÁZOLVA

Ampicillin

Az abszorbancia eredmények harmadik és negyedik oszlopában (8. ábra) az ampicillin hatását figyelhetjük meg a törzsekre. Egyértelműen látszik az eredményekből és a 9. ábrán látható diagramból is (fekete színnel jelölt adatok), hogy egyik törzs sem rendelkezik ampicillin elleni rezisztenciával. Minden érték nagyságrendileg kisebb a pozitív kontrollhoz képest.

Ellentétben az eredményeimel Rossi és munkatársai (2014) vizsgálataik során több olyan *L. paracasei* törzset is találtak, melyek az EFSA által meghatározott határértéken ampicillinre rezisztensnek bizonyultak. Ezeknél a törzseknél a MIC (minimális gátló koncentráció) értékek alacsonyak vagy közepesek voltak, legfeljebb nyolcszorosa a határértéknek.

Eritromicin

Eritromicin esetében is egyértelműen hatásosnak bizonyult az antibiotikum minden vizsgált törzssel szemben, mely az eredmények 7. és 8. oszlopában (8. ábra), valamint a diagrammon

a sárgával jelölt értékeken (9. ábra) is látható. Ez alátámasztja a korongdiffúziós módszerrel kapott eredményeimet.

Comunian és munkatársai (2010) hasonló eredményeket kaptak vizsgálataik során. Olaszország különböző földrajzi területeiről származó, fermentált termékekből izolált *Lactobacillus paracasei* törzsek eritromicinnel szembeni érzékenységét is vizsgálták az EFSA által meghatározott antibiotikum koncentrációt alkalmazva. Eredményül azt kapták, hogy 121 vizsgált törzs közül 94,2% volt érzékeny az eritromicinre.

Kanamycin

Az eredmények 5. és 6. oszlopa (8. ábra) azt mutatja az abszorbancia értékek alapján, hogy minden vizsgált törzs zavartalanul szaporodott az inkubáció alatt, tehát a törzsek rezisztensek a kanamicinre. Ez a diagramon (9. ábra) is igen látványosan mutatkozik a szürkével jelölt értékeken. Sok esetben a kontrollhoz képest minimálisan, de magasabb értékek is megfigyelhetők, mely azt jelenti, hogy a szuszpenzió fényáteresztő képessége alacsonyabb volt, tehát több sejt van az adott lyukakban. Mivel igen kis mennyiségekről van szó, nagy valószínűséggel pipettázási hibákból adódik ez az eltérés.

Mangia és munkatársai (2018) juhsajtából izolált potenciálisan probiotikus hatású tejsavbaktériumokat vizsgáltak. Hasonlóan az én eredményeimhez, az általuk vizsgált törzsek is érzékenyek bizonyultak klóramfenikolra, eritromicinre és ampicilinre, míg kanamicinre rezisztensek voltak.

Sztreptomicin

A sztreptomicin eredményeit a 8. ábrán kék színnel ábrázoltam, jól látszik, hogy a pozitív kontrollhoz viszonyítva átlagosan 65%-os abszorbancia értéket mutattak. Vagyis az antibiotikum nem gátolta a törzsek szaporodását teljes mértékben, de némi gátló hatást kifejtett, ha összevetjük az értékeket a pozitív kontrollal.

Fontos kiemelni az **MA46** törzset, mely esetében nem volt jelentős különbség a kontroll és a sztreptomicint tartalmazó lyuk abszorbancia értéke között, tehát a törzs rezisztens az antibiotikumra, így zavartalanul szaporodott.

Solieri és munkatársai (2014) hosszú érlelésű sajtokból izolált tejsavbaktériumok probiotikus alkalmasságát vizsgálták, mely során antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztenciát is mértek. Az általuk vizsgált összes *L. paracasei* törzs érzékeny volt ampicilinre, eritromicinre és klóramfenikolra, viszont a sztreptomicinre rezisztenciát

mutattak, mely eredmények nagyon hasonlóak az enyémekekhez. További vizsgálataik során kiderült, hogy egyetlen törzs sem tartotta meg sztreptomycin rezisztenciáját epesók jelenlétében, mely információ a probiotikumként történő alkalmazás szempontjából fontos.

Klóramfenikol

A diagramon (9. ábra) zölddel jelölt adatok a törzsek klóramfenikolra adott eredményeit jelzik. Itt megfigyelhető, hogy a pozitív kontrollhoz viszonyítva átlagosan 20%-os abszorbancia értékeket kaptam eredményül. Mivel ilyen alacsony az abszorbancia értékek, hatásosnak tekintetem az antibiotikumot az adott koncentrációban, tehát gátolta a törzsek szaporodását.

Damodharan és munkatársai (2019) egy Indiában izolált *L. paracasei* törzs antimikrobiális tulajdonságait vizsgálták az EFSA által előírt antibiotikum koncentrációk mellett. A KNI9-es törzs érzékenységét többek között a klóramfenikolra, eritromicinre, illetve sztreptomycinre is vizsgálták. Az én eredményeimhez hasonlóan a törzs klóramfenikolra és eritromicinre az ő esetükben is érzékenynek bizonyult. Azonban az eredményeimmel ellentétben nekik sztreptomycinre is érzékenynek bizonyult a törzs.

Összességében megállapítható, hogy az EFSA által előírt koncentrációk magas határfokúnak bizonyultak az ampicillin, az eritromicin és a klóramfenikol esetében is a vizsgált törzsekkel szemben. A kanamicin és a sztreptomycin esetében az előírt antibiotikum koncentrációk nem voltak gátló hatással a törzsekre. Mindkét antibiotikum koncentrációja 64 mg/L-nek határozta meg az EFSA, az abszorbancia eredményekből azonban látszik, hogy a sztreptomycin antimikrobiális hatása erősebb a törzsekre. Mivel mindegyik törzs mutatott rezisztenciát az EFSA által meghatározott koncentráción a kanamicin és a sztreptomycin esetében is, így egyik sem alkalmazható takarmány kiegészítőként, mivel fennáll a rezisztencia átadásának veszélye más, esetleg patogén mikrobának.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A Bürker-kamrás sejtszámlálásnál csomósnak látott MA43-as törzs csomósodásának okát szívesen vizsgálnám a jövőben, mivel a *L. paracasei* faj törzseire ez a tulajdonság általánosságban nézve nem jellemző.

A korongdiffúziós módszer egy nagyon egyszerű és kis költségű eljárás, mely tulajdonságok alkalmassá teszik kisebb laboratóriumok számára, vagy oktatási célú használatra. Ahogy munkám során is tapasztaltam, ezekkel az anyagokkal és eljárásokkal nem ad a módszer megbízható eredményt, így még további fejlesztésére lesz szükség. Például nagyobb korongok lyukasztása, vagy más anyagok keresése, mely esetleg több folyadékot képes magába szívni, illetve jobban rásimul a tápagar felületére, segíthetné javítani a módszer hatékonyságát. A módszer másik eleme, ami befolyásolhatta az eredményeket a mikrobák szélesztése volt, így érdemes megpróbálni lemezöntéssel. Mindazonáltal, ha a módszer megbízhatóan fog működni, csökkenthetőek vele a laboratóriumi költségek.

Az abszorbancia mérésnél minden általam vizsgált törzs pozitív kontrollja felszaporodott, így minden antibiotikumra adott reakció eredményét értékelhettem.

Az abszorbancia mérést egyszer végeztem el, így a mérési eredmények megerősítése még szükséges, ezért a jövőben szükséges lesz megismételni őket. Az egyszeri mérésem alapján a vizsgált törzsek midegyike mutatott rezisztenciát az EFSA által előírt koncentráción a kanamicinre és a sztreptomycinre, ezeknek MIC tesztjét is érdemes lenne a jövőben elvégezni, amennyiben a megismételt abszorbancia vizsgálat megerősíti a korábbi mérési eredményeimet.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A tejsavbaktériumokat rengeteg helyen alkalmazzák az élelmiszeriparban, valamint probiotikumként történő alkalmazásuk is egyre gyakoribb. Az emberi fogyasztás mellett állati takarmány adalékként is egyre fontosabb szerepet kapnak.

Munkám során *Lactobacillus paracasei* fajhoz tartozó 16 törzs antibiotikum rezisztenciáját vizsgáltam. A vizsgált antibiotikumok az ampicilin, kanamicin, eritromicin, sztreptomycin és a klóramfenikol voltak.

A 16 törzsből nagyságrendileg azonos sejtkoncentrációjú szuszpenziót kellett készítenem az abszorbancia vizsgálatához. Ehhez Bürker-kamrát használtam. A rezisztencia vizsgálat egyik részét korongdiffúziós módszerrel végeztem, mely során a táptalajra széleszttem a törzseket, majd házilag készítettem, az EFSA által meghatározott koncentrációjú antibiotikummal átitatott korongokat helyeztem a felületére. Eredményül azt kaptam, hogy az eritromicinen kívül a többi antibiotikumra rezisztens az összes törzs. Mivel ezt az eredményt nem tartottam valószínűnek, abszorbancia vizsgálatot is végeztem.

A mérés során a pozitív kontrollok szemmel láthatóan és az eredmények alapján is felszaporodtak, így mindegyik eredményt tudtam értékelni. Az ampicilin, az eritromicin és a klóramfenikol is magas hatásfokkal gátolta a baktérium törzsek növekedését az EFSA által meghatározott koncentráción. Ezekkel szemben a törzsek kanamicinre és sztreptomycinre rezisztensnek bizonyultak, az adott koncentrációban.

Eddigi eredményeim alapján az EFSA által meghatározott antibiotikum koncentrációkon mindegyik törzs mutatott rezisztenciát valamely antibiotikumra, így egyik törzs sem alkalmazható takarmány adalékanyagként a rezisztencia átadásának kockázata miatt.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Barcs, I. (2009). Antibiotikum-érzékenység és -rezisztencia, A Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar Népegészségtani Intézetének kiadványa. Forrás: <https://semmelweis.hu/korhazhigiene/files/2012/06/rezisztencia.pdf>
- Batt, C. A. (2014). LACTOBACILLUS | Introduction. Encyclopedia of Food Microbiology, 409–411. doi:DOI:10.1016/b978-0-12-384730-0.00176-2
- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D., Piddock, L., & . (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51. doi:DOI:10.1038/nrmicro3380
- Castle, S. (2007). Ampicillin. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, 1–6. doi:DOI:10.1016/b978-008055232-3.61227-9
- Comunian, R., Daga, E., Dupré, I., Paba, A., Devirgiliis, V., Piccioni, V., & Giraffa, G. (2010). *Susceptibility to tetracycline and erythromycin of Lactobacillus paracasei strains isolated from traditional Italian fermented foods. International Journal of Food Microbiology.* doi:DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.018
- Damodharan, K., Palaniyandi, S., Suh, J.-W., Yang, S., ., & . (2019). Probiotic Characterization of Lactobacillus paracasei subsp. paracasei KNI9 Inhibiting Adherence of Yersinia enterocolitica on Caco-2 Cells In Vitro. Probiotics and Antimicrobial Proteins. doi:DOI:10.1007/s12602-019-09535-8
- Delcour, A. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808-816. doi:DOI:10.1016/j.bbapap.2008.11.005

- Elizaveta, A., Islamiya, G., Guzel, K., Dina, Y., ., & . (2022). Alarming Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Probiotic Preparations and Dietary Supplements. Forrás: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111557>
- Gibson, G., & Roberfroid, M. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. doi:DOI:10.1093/jn/125.6.1401
- Hegyí, G., dr. Kardos, J., dr. Kovács, M., dr. Málnási-Czizmadia, A., Micsonai, A., dr Nyitray, L., . . . dr. Venekei, I. (2003). Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet. Eötvös Loránd Tudományegyetem. Forrás: https://www.eltereader.hu/media/2014/04/Bev_a_BIOKEMIABA_READER.pdf
- Holzapfel, W., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J., & . (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 85–101. doi:DOI:10.1016/s0168-1605(98)00044-0
- Internet 1. (dátum nélk.). *Bürker-kamra. Letöltés dátuma: 2023.03.15.* Forrás: <https://labtutorials.files.wordpress.com/2013/08/burker2.jpg>
- Kohanski, M., Dwyer, D., Collins, J., ., ., & . (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423–435. doi:DOI:10.1038/nrmicro2333
- Kunglné Nagy, Z. (2013). Környezettoxikológia Laboratóriumi gyakorlat. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék. Forrás: http://envirottox.hu/wp-content/uploads/2018/09/K%C3%B6rnytox_A-laborgyak_v%C3%ADzi-tesztorganizmus-gyakorlat.pdf
- Liao, S., & Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, 3(4), 331–343. doi:DOI:10.1016/j.aninu.2017.06.007
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10), 622–628. doi:DOI:10.1016/j.mpmmed.2017.07.006
- Mangia, N., Saliba, L., Deiana, P., ., ., & . (2018). Functional and safety characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its

- survival in sheep and cow fermented milks during cold storage. *Annals of Microbiology*, 69(2), 161–170. doi:DOI:10.1007/s13213-018-1416-1
- Manning, T., & Gibson, G. (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 287–298. doi:DOI:10.1016/j.bpg.2003.10.008
- Mézes, M., & Kulcsár, S. (2019). Az antibiotikumok felhasználásának takarmánybiztonsági problémái és lehetőségek azok kiváltására. Forrás: http://real-j.mtak.hu/16368/1/%C3%81TT%202020_1%20FINAL.pdf
- Pécs, M. (2009). Antibiotikumok, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék. Forrás: http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/abet/Biotermekek_technologia/MSc_Biotermekek_2/06%20Antibiotikumok/B%C3%A9taLakt%C3%A1mAntibiotikumok.pdf
- Rossi, F., Di Renzo, T., Preziuso, M., Zotta, T., Iacumin, L., Coppola, R., & Reale, A. (2014). Survey of antibiotic resistance traits in strains of *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1763–1769. doi:DOI:10.1007/s13213-014-1015-8
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M., Bories, G., . . . Saarela, M. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16(3). doi:DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- Sharma, C., Rokana, N., Chandra, M., Singh, B., Gulhane, R., Gill, J., & Panwar, H. (2018). Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 4. doi:DOI:10.3389/fvets.2017.00237
- Solieri, L., Bianchi, A., Mottolèse, G., Lemmetti, F., Giudici, P., & . (2014). Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis. *Food Microbiology*, 38, 240–249. doi:DOI:10.1016/j.fm.2013.10.003
- Tang, Q., Hao, Y., Wang, L., Lu, C., Li, M., Si, Z., & Lu, Z. (2021). Characterization of a bacterial strain *Lactobacillus paracasei* LP10266 recovered from an endocarditis patient in Shandong, China. *BMC Microbiology*, 21(1). doi:DOI:10.1186/s12866-021-02253-8

- Tenover, F. (2015). Antimicrobial Susceptibility Testing☆. Reference Module in Biomedical Sciences. doi:DOI:10.1016/b978-0-12-801238-3.02486-7
- Vardanyan, R., & Hruby, V. (2006). Antibiotics. Synthesis of Essential Drugs, 425–498. doi:DOI:10.1016/b978-044452166-8/50032-7
- Wood, B., & Holzapfel, W. (1995). The Genera of Lactic Acid Bacteria. doi:DOI:10.1007/978-1-4615-5817-0
- World Health Organization. (2001). WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Forrás: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66860/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.2.pdf
- Wright, G. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? Current Opinion in Microbiology, 13(5), 589–594. doi:DOI:10.1016/j.mib.2010.08.005

9. JEGYZÉKEK

9.1. ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra Gram-pozitív baktériumok filogenetikai törzsfája	4
2. ábra Bürker-kamra felépítése (Internet 1)	14
3. ábra: Antibiotikummal átitatott korongok készítése házilag lamináris box alatt	18
4. ábra: Az abszorbancia méréshez használt plate. A minták kiosztása a 4. táblázatban látható.....	19
5. ábra: Bal oldalt a Bürker-kamra kis négyzetében jól látható és elkülönült telepképző egységek, míg jobb oldalt az MA43 törzs összeállt sejtjei láthatóak.....	21
6. ábra: MA27 törzs antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata korongdiffúziós módszerrel. Eritromicinre jól látható gátlási zóna jelent meg, míg az ampicillin és a sztreptomycin esetében nem lehet gátlási zónát látni	23
7. ábra: MA9 törzs klóramfenikolra adott szabálytalan alakú gátlási zónája.....	24
8. ábra: Az abszorbancia mérés eredményei. A plate-kiosztása a 4. táblázatban látható. A 9. ábrán használt színekkel jelöltem az antibiotikumokat	25
9. ábra: Törzsek antibiotikumokra adott abszorbancia értékei vonaldiagramon ábrázolva	26

9.2. TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. táblázat: MRS (De Man, Rogosa, Sharpe Broth) tápleves összetétele	16
2. táblázat: Peptonvíz összetétele.....	17
3. táblázat: <i>L. paracasei</i> antibiotikum határértékei mg/L-ben megadva.....	18
4. táblázat Minták elhelyezkedése a plate-en	19
5. táblázat: A vizsgált törzsek sejtkoncentrációja Bürker-kamrás sejtszámlálással	20
6. táblázat: A vizsgált törzsek gátlási zónái mm-ben megadva eritromicin esetében	22

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kosztik Juditnak

azt a rengeteg támogatást, mellyel a kutatói munkámat, illetve ennek a dolgozatnak

a létrejöttét a kezdetektől a végleges formáig segítette.

Borosi Bernadett Szakdolgozat

Szerzői nyilatkozat

Alulírott Borosi Bernadett (név)
BSc Biomérnöki, Nappali (szak, tagozat)

kijelentem, hogy a *Lactobacillus paracasei* 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 valótlanul 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

**A nem kívánt rész törölendő
Az adatokat kérjük géppel kitölteni!*

NYILATKOZAT

a szakdolgozat, diplomamunka nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A szerző neve: Borosi Bernadett

A dolgozat címe: *Lactobacillus paracasei* törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata

A megjelenés éve: 2023

A tanszék neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom.

A leadott dolgozat, mely védett, a szerző nevének vízjelével ellátott pdf dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a SZIE Budai Campus Igazgatóság Entz Ferenc Könyvtár és Levéltár szakdolgozat archívumába.

A dolgozat bibliográfiai leírása az Entz Ferenc Könyvtár és Levéltár elektronikus katalógusából érhető el: <http://opac.szie.hu/entzferenc/>. A teljes szöveg kizárólag a Budai Campus számítógépeiről tekinthető meg.

Tudomásul veszem, hogy a vízjel nélkül leadott dokumentum szerzői jogai sérülhetnek.

A Nyilatkozat a dolgozat adatainak megadásával érvényes, melyet az elektronikus hordozóval együtt leadok.

Budapest, 2023.05.03


a szerző aláírása

*Az adatokat kérjük géppel kitölteni!

**Megfelelő aláhúzendő vagy géppel való kitöltés esetén törölhető!

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Borosi Bernadett (M4GDC9) 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 védelemre javaslom / nem javaslom¹.

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

Kelt: Budapest, 2023. 05. 02.


Belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.