

**TEJSAVBAKTÉRIUMOK ÉS ÉLELMISZER-EREDETŰ ROMLÁS- ÉS
KÓROKOZÓ BAKTÉRIUMOK VERSENGŐ KÖLCSÖNHATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA**

Szekér Krisztina

Budapest, 2007

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsa 2007. október 2-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS

Tagjai

Deák Tibor, DSc

Reichart Olivér, CSc

Szigeti Jenő, CSc

Opponensek

Varga László, PhD

Varga Zsuzsa, PhD

Titkár

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|-----------|
| TARTALOMJEGYZÉK..... | 3 |
| 1. BEVEZETÉS..... | 6 |
| 2. CÉLKITŰZÉSEK..... | 7 |
| 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS..... | 8 |
| 3.1. TEJSAVBAKTÉRIUMOK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE | 8 |
| 3.2. TEJSAVBAKTÉRIUMOK RENDSZERTANA | 8 |
| 3.3. TEJSAVBAKTÉRIUMOK ANYAGCSERÉJE | 10 |
| 3.4. TEJSAVBAKTÉRIUMOK ANTIMIKROBÁS ANYAGAI..... | 10 |
| 3.4.1. <i>A pH és a szerves savak</i> | 10 |
| 3.4.2. <i>Hidrogén-peroxid</i> | 11 |
| 3.4.3. <i>Bakteriocinek</i> | 11 |
| 3.4.3.1. <i>Nizin</i> | 11 |
| 3.5. TEJSAVBAKTÉRIUMOK SZEREPE A FERMENTÁLT ÉLELMISZEREK ELŐÁLLÍTÁSÁBAN | 13 |
| 3.6. TEJSAVBAKTÉRIUMOK SZEREPE AZ ÉLELMISZER TARTÓSÍTÁSBAN | 14 |
| 3.6.1. <i>Az élelmiszer tartósítás új kihívásai</i> | 14 |
| 3.6.2. <i>A kombinált tartósítás gát elve</i> | 15 |
| 3.6.3. <i>Tejsavbaktériumok a gát elméletben</i> | 16 |
| 3.6.3.1. <i>Versengő mikroflóra</i> | 16 |
| 3.6.3.2. <i>pH, savak és hidrogén-peroxid</i> | 16 |
| 3.6.3.3. <i>Bakteriocinek</i> | 17 |
| 3.7. TEJSAVBAKTÉRIUMOK ÉS A BIOFILM | 18 |
| 3.7.1. <i>A baktérium biofilmek jelentősége az élelmiszeriparban</i> | 18 |
| 3.7.2. <i>A baktérium biofilmek kialakulása és szerkezete</i> | 19 |
| 3.7.3. <i>A baktériumok felszínhez tapadását befolyásoló tényezők</i> | 20 |
| 3.7.3.1. <i>A mikroorganizmus tulajdonságai</i> | 21 |
| 3.7.3.2. <i>A felszín tulajdonságai</i> | 22 |
| 3.7.3.3. <i>A közeg tulajdonságai</i> | 24 |
| 3.7.4. <i>Biofilm elleni védekezés</i> | 24 |
| 3.7.5. <i>Biofilmek vizsgálatának lehetőségei és nehézségei</i> | 26 |
| 3.8. TEJSAVBAKTÉRIUMOK, MINT PROBIOTIKUMOK | 27 |
| 3.8.1. <i>A probiotikum definíciója</i> | 27 |
| 3.8.2. <i>A probiotikumok felfedezése</i> | 27 |
| 3.8.3. <i>Az emberi gyomor-bél rendszer mikrobiótája</i> | 28 |
| 3.8.4. <i>Probiotikus törzsek tulajdonságai</i> | 29 |
| 3.8.5. <i>Prebiotikumok</i> | 31 |
| 3.8.6. <i>Adhézió</i> | 31 |
| 3.8.7. <i>Tapadásteszt</i> | 32 |
| 3.8.8. <i>Detektálási módszerek</i> | 33 |
| 3.9. ÉLELMISZER-EREDETŰ ROMLÁS-, ÉS KÓROKOZÓ BAKTÉRIUMOK..... | 35 |
| 3.9.1. <i>Pseudomonas fajok és a Pseudomonas fluorescens</i> | 35 |
| 3.9.2. <i>Bacillus fajok és a Bacillus cereus</i> | 35 |
| 3.9.3. <i>Listeria fajok és a Listeria monocytogenes</i> | 37 |
| 3.9.4. <i>Az Enterobacteriaceae család és az Escherichia coli</i> | 37 |
| 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK..... | 39 |
| 4.1. BAKTÉRIUMTAPADÁS VIZSGÁLATA ROZSDAMENTES ACÉLON | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.1. Mikroorganizmusok | 39 |
| 4.1.2. A rozsdamentes acél..... | 39 |
| 4.1.3. Baktériumtapadás vizsgálata függőleges helyzetű kuponon | 39 |
| 4.1.3.1. Törzsszuspenzió készítése..... | 39 |
| 4.1.3.2. Tapadásvizsgálat | 40 |
| 4.1.3.3. A tapadó baktériumok számának meghatározása lemezöntéssel..... | 41 |
| 4.1.3.4. Mikroszkópos vizsgálat | 41 |
| 4.1.4. Baktériumtapadás vizsgálata vízszintes helyzetű kuponon | 43 |
| 4.1.4.1. Törzsszuspenzió készítése..... | 43 |
| 4.1.4.2. Tapadásvizsgálat [CHAE et SCHRAFT 2001] nyomán..... | 43 |
| 4.1.4.3. Mikroszkópos vizsgálat | 44 |
| 4.2. BAKTÉRIUMTAPADÁS VIZSGÁLATA BÉLHÁMSEJTEKEN | 45 |
| 4.2.1. Mikroorganizmusok | 45 |
| 4.2.2. Caco-2 sejtkultúra..... | 45 |
| 4.2.3. Baktérium törzsszuspenziók készítése..... | 46 |
| 4.2.4. Tapadásvizsgálat különböző detektálási módszerekkel | 46 |
| 4.2.4.1. Tapadásvizsgálat | 46 |
| 4.2.4.2. A tapadó baktériumok számának meghatározása lemezöntéssel..... | 47 |
| 4.2.4.3. Mikroszkópos vizsgálat | 47 |
| 4.2.5. Lactobacillus törzsek tapadásának tesztelése | 48 |
| 4.2.5.1. Tapadásvizsgálat | 48 |
| 4.2.5.2. Mikroszkópos vizsgálat | 48 |
| 4.2.6. A Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum 2749 tapadásának vizsgálata a kiindulási koncentráció függvényében | 48 |
| 4.2.6.1. Tapadásvizsgálat | 48 |
| 4.2.6.2. A tapadó baktériumok számának meghatározása | 49 |
| 4.2.7. A Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum 2749 és az Escherichia coli Bay 100 törzsek versengő tapadásának vizsgálata | 49 |
| 4.2.7.1. Tapadásvizsgálat | 49 |
| 4.2.7.2. A tapadó baktériumok számának meghatározása | 49 |
| 4.3. VERSENGŐ SZAPORODÁS VIZSGÁLATA FOLYÉKONY TÁPKÖZEGEKBEN..... | 50 |
| 4.3.1. Mikroorganizmusok | 50 |
| 4.3.2. Bacillus cereus T törzs nizin érzékenységének vizsgálata | 50 |
| 4.3.3. Lactococcus lactis subsp. lactis 1881 és Bacillus cereus T versengő szaporodása PCB-ben | 50 |
| 4.3.4. Lactococcus lactis subsp. lactis 1881 és Bacillus cereus T versengő szaporodása tejben..... | 51 |
| 4.3.5. Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum 2749 és Escherichia coli Bay100 versengő szaporodása csicsókalében..... | 52 |
| 5. EREDMÉNYEK | 53 |
| 5.1. BAKTÉRIUMTAPADÁS VIZSGÁLATA ROZSDAMENTES ACÉLON | 53 |
| 5.1.1. Baktériumtapadás vizsgálata függőleges helyzetű kuponon - Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus és P. fluorescens kölcsönhatása | 53 |
| 5.1.1.1. A tapadó baktériumok élő csíraszámának meghatározása lemezöntéssel | 53 |
| 5.1.1.2. A tapadó baktériumok mikroszkópos vizsgálata | 54 |
| 5.1.2. Baktériumtapadás vizsgálata függőleges helyzetű kuponon - Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus és L. monocytogenes kölcsönhatása | 57 |
| 5.1.2.1. A tapadó baktériumok élő csíraszámának meghatározása lemezöntéssel | 57 |
| 5.1.2.2. A tapadó baktériumok mikroszkópos vizsgálata | 59 |
| 5.1.3. Baktériumtapadás vizsgálata vízszintes helyzetű kuponon | 60 |
| 5.1.3.1. A tapadó baktériumok mikroszkópos vizsgálata | 60 |

| | |
|--|------------|
| 5.2. BAKTÉRIUMTAPADÁS VIZSGÁLATA BÉLHÁMSEJTEKEN | 63 |
| 5.2.1. Tapadásvizsgálat különböző detektálási módszerekkel | 63 |
| 5.2.2. <i>Lactobacillus törzsek tapadásának tesztelése</i> | 66 |
| 5.2.3. <i>A Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum 2749 törzs tapadásának vizsgálata a kiindulási koncentráció függvényében</i> | 68 |
| 5.2.4. <i>A Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum 2749 és az Escherichia coli Bay 100 törzsek versengő tapadásának vizsgálata</i> | 70 |
| 5.3. VERSENGŐ SZAPORODÁS VIZSGÁLATA FOLYÉKONY TÁPKÖZEGEKBEN..... | 75 |
| 5.3.1. <i>Bacillus cereus T vegetatív sejtjei nizin érzékenységének vizsgálata</i> | 75 |
| 5.3.2. <i>Lactococcus lactis subsp. lactis 1881 és Bacillus cereus T versengő szaporodása PCB-ben</i> | 75 |
| 5.3.3. <i>Lactococcus lactis subsp. lactis 1881 és Bacillus cereus T versengő szaporodása tejben</i> | 79 |
| 5.3.4. <i>Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum 2749 és Escherichia coli Bay100 versengő szaporodása csicsókalében</i> | 81 |
| 5.4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK..... | 85 |
| 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK..... | 86 |
| 7. ÖSSZEFOGLALÁS..... | 88 |
| 8. SUMMARY | 94 |
| 9. MELLÉKLETEK | 100 |
| M.1. FELHASZNÁLT IRODALOM | 100 |
| M.2. RECEPTEK..... | 110 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 112 |

1. BEVEZETÉS

A tejsavbaktériumokkal erjesztett különféle élelmiszerek előállítása több ezer éves múltra tekint vissza, mivel az anyagcsere folyamataik során képződő savak és aromaanyagok kedvező tulajdonságú, tápanyagokban és ízanyagokban gazdag, ugyanakkor antinutritív anyagokban szegényebb termékek kialakulását eredményezik. Ezen kívül – tekintve, hogy az élelmiszer fermentációkban részt vevő fajokat hosszú ideje biztonságosan használják fel – a tejsavbaktériumok a GRAS (Generally Recognised As Safe) kategóriába tartoznak, azaz biztonságosan felhasználhatók az élelmiszer termelésben.

A tejsavbaktériumokkal erjesztett termékek nem csupán ízanyagokban gazdagabbak, hanem az alapanyaghoz képest biztonságosabbak, hosszabb ideig eltarthatók is, ami a fermentáció során keletkező antimikrobás anyagok hatásának köszönhető. Ezek elsősorban: a szerves savak (valamint a savas pH), a hidrogén-peroxid és a fehérje természetű antimikrobás anyagok, a bakteriocinek. A tejsavbaktériumok ezen tulajdonságait kihasználva külön erre a célra kifejlesztett védőkultúrákat is alkalmaznak a fermentáció során, amelyek pl. bakteriocin-képző képességük segítségével pusztítják el a terméket fertőző romlás- és/vagy kórokozó mikroorganizmusokat. Ez az eljárás összhangban van a megváltozott fogyasztói elvárásokkal is, melyek a természetesebb állapotú, kevesebb kémiai tartósítószerrel tartalmazó termékeket igénylik.

Az élelmiszer-előállító üzemek higiéniai állapota alapvető fontosságú a biztonságos élelmiszertermelésben. A nyersanyagról vagy a levegőből az üzembe kerülő káros mikroorganizmusok megtelepedhetnek és bevonatokat (biofilmet) képezhetnek a különböző üzemi felületeken és ezáltal folyamatos fertőzési forrást jelentenek, termékvesztést és élelmiszer-biztonsági problémákat okozva a feldolgozott termékben. Erre a problémára megoldást jelenthet az üzem ún. „házi mikroflórájának” gátló hatása, amikor az autochton mikrobafajok (pl. tejsavbaktériumok) a kötőhelyekért és a tápanyagokért való versengés, antimikrobás anyagok vagy gátló hatású extracelluláris polimer mátrix (EPS) termelése révén akadályozzák meg a káros mikroorganizmusok megtelepedését, elszaporodását.

Az utóbbi néhány évtizedben kezdett ismertté válni, hogy milyen élettani-biokémiai folyamatok állnak az egészséges bélflóra egészségvédő hatása mögött. A bélflóra hasznos baktériumainak – elsősorban tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok – szerepe sokrétű. Részt vesznek többek között a kórokozó mikroorganizmusok visszaszorításában, részben a kötőhelyek térbeli gátlása, részben az antimikrobás hatású anyagcsere termékek révén, amelyek ugyanolyan hatékonyak a bélcsatorna lumenében, mint az élelmiszer mátrixokban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseim a következők voltak:

- Tejsavbaktériumok és romlás/kórokozó baktériumok kölcsönhatásának vizsgálata rozsdamentes acél felületen.
- Jó adhézios képességű tejsavbaktérium törzs(ek) szelektálása Caco-2 bélhámsejt vonalon és a tapadás vizsgálata a koncentráció függvényében.
- Tejsavbaktériumok és kórokozó baktériumok kölcsönhatása bélhámsejtek felszínén.
- Tejsavbaktériumok és romlás/kórokozó baktériumok kölcsönhatásának vizsgálata laboratóriumi táptalajban és folyékony élelmiszerekben.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Tejsavbaktériumok általános jellemzése

A „tejsavbaktériumok” (angolul: Lactic Acid Bacteria, LAB) név nem rendszertani kategória, hanem közös anyagcsere és élettani sajátosságokkal rendelkező baktériumcsoportok gyűjtőneve. Az ide tartozó baktériumok Gram-pozitív, spórát nem képző, kataláz- és oxidáz negatív pálcák vagy kokkusok, melyek szénhidrátokból szigorúan fermentatív módon nyernek energiát, melynek fő végterméke a tejsav. A tejsavbaktériumoknak nincsenek citokrómjaik, nem aerobok és jól tolerálják a savas környezetet. Bár az anyagcseréjükhöz nincs szükség oxigénre, képesek oxigén jelenlétében is növekedni (aerotoleráns anaerobok). Tápanyag-ellátás szempontjából nagyon igényesek: komplex igényük van szénhidrátokra, aminosavakra, fehérjékre, zsírsavészterekre, sókra, nukleinsav származékokra és vitaminokra. A fenti általános jellemzés kivételeiként olyan fajok is előfordulnak a tejsavbaktériumok között, amelyek katalázt vagy citokrómot képeznek hematin tartalmú táptalajokban (a hem forrás például a vér), illetve hem-et nem tartalmazó katalázt, pszeudokatalázt termelő fajok is vannak [HOLZAPFEL et al. 2001].

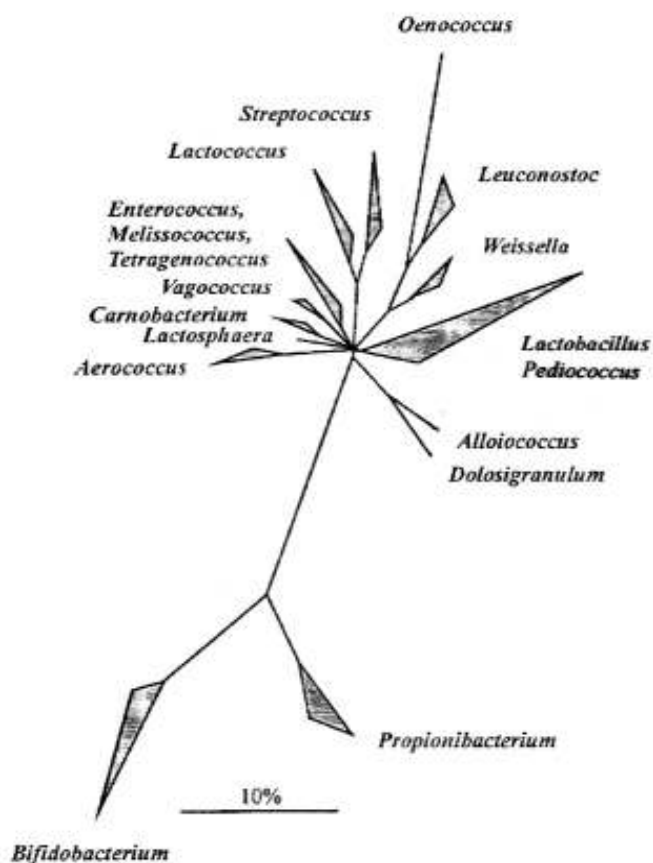
Komplex tápanyagigényük miatt elsősorban olyan élőhelyeken fordulnak elő, ahol nagy mennyiségű oldott szénhidrát, fehérje bomlási termékek és vitaminok vannak jelen: növényeken és növényi eredetű anyagokon, erjesztett vagy romlott élelmiszerekben, emberi és állati szervezetek tápcsatornájában, stb [HAMMES & VOGEL 1995].

3.2. Tejsavbaktériumok rendszertana

A tejsavbaktériumokhoz tartozó nemzetségeket, az *Eubacteria* doménen belül a *Firmicutes* törzsben találjuk. Az ide tartozó baktériumok – az atipikus sejtfallal rendelkező csoportoktól eltekintve – mind Gram-pozitív módon festődnek és kis és nagy G+C tartalmú csoportokra oszlanak. A G+C tartalom a DNS guanin+citozin tartalmának mol%-ban kifejezett aránya, meghatározása az egyik fontos lépése a genotípus alapján történő rendszerezésnek. A tejsavbaktériumok a kis G+C tartalmú csoportba tartoznak, a DNS G+C aránya 55 mol% alatti.

Érdemes megjegyezni, hogy a bifidobaktériumok, melyeknek több hasonló tulajdonságuk van tejsavbaktériumokkal, és ezért hagyományosan és gyakorlati okokból még a LAB egyik csoportjának tartják őket, filogenetikailag teljesen elkülönülnek: G+C tartalmuk 55-67 mol% (az Actinobacteria csoportba tartoznak).

A tejsavbaktériumokhoz tartozó nemzetségek 16S rRNS szekvenciáin alapuló konszenzus fáját az 1. ábra mutatja. A törzsfá szerint közeli rokon a *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactosphaera* és *Melissococcus* nemzetség. Ugyancsak közeli rokonságban van a *Lactococcus* és *Streptococcus* nemzetség, míg a *Lactobacillus* nemzetség egy filogenetikailag különálló ágat alkot. A *Lactobacillus* és a *Pediococcus* nemzetségek filogenetikailag keverték, hiszen 5 *Pediococcus* faj egy csoportba került 32 homo- illetve heterofermentatív *Lactobacillus* fajjal az ún. *Casei* és *Pediococcus* csoportban. Ez egyébként jó példa arra, hogy a *Pediococcus* és a *Lactobacillus* nemzetségek, melyeket a fenotipusos jellemzők alapján – pl. sejtmorfológia, fermentáció típusa – hoztak létre, nincsenek összhangban a filogenetikai alapú csoportosítással. A *Lactobacillus* nemzetség genetikai heterogenitására utal az is, hogy a különböző fajok G+C tartalma nagyon széles, 32-55 mol% közötti tartományban helyezkedik el, míg általában ha két faj között több, mint 10 mol% a különbség, akkor már nem tartoznak ugyanabba a nemzetségbe [The Prokaryotes, 2005].



1. ábra: 16S rRNS szekvenciák összehasonlító elemzésén alapuló konszenzus fa, amely a nagyobb, tejsavbaktériumokhoz tartozó filogenetikai csoportokat, valamint a nem rokon, nagy G+C tartalmú *Bifidobacterium* és *Propionibacterium* nemzetségeket mutatja. A vonal a filogenetikai távolságot jelöli ([HOLZAPFEL et al. 2001 és The Prokaryotes, 2005] nyomán).

3.3. Tejsavbaktériumok anyagcseréje

A szénhidrátok lebontása a tejsavbaktériumokban két lényegesen különböző biokémiai úton folyhat: homofermentatív és heterofermentatív módon. Homofermentatív lebontás esetén a végtermékek több, mint 85%-a tejsav, míg a heterofermentatív anyagcsere során a tejsav mellett szén-dioxid és ecetsav és/vagy etanol is keletkezik (valamint kisebb mennyiségben hangyasav és glicerin). Az eltérő anyagcsere magyarázata, hogy a homolaktikus fajok (pl. *Lactobacillus delbrueckii*) a hexózokat a glikolízis útvonalán bontják le, míg a heterolaktikus fajok (pl. *Lactobacillus fermentum*) a pentózfoszfát útvonalon. Az utóbbi útvonal meglétéhez szükséges a foszfoketoláz enzim, ami a glükonsavból képződő pentózokat hasítja, és ami hiányzik az obligát homofermentatív fajokból. Az obligát homo- illetve heterolaktikus fajok mellett léteznek még fakultatív heterofermentatív tejsavbaktériumok (pl. *Lactobacillus plantarum*) is, melyek a glükózból csak tejsavat termelnek, viszont erjesztik a glükonsavat és a pentózokat is.

3.4. Tejsavbaktériumok antimikrobás anyagai

3.4.1. A pH és a szerves savak

A fermentáció során a tejsavbaktériumok az alapanyagban található szénhidrátokat (elsősorban a glükózt és a laktózt) anaerob módon tejsavvá bontják, ezáltal a termék pH-ját a savas tartományig csökkentik (pH<4,5). Ezt a savas közeget a tejsavbaktériumok többnyire jól torelálják, viszont sok más baktérium (köztük romlás- és kórokozók) nem viselik el. A savas pH denaturáló hatással van a sejtfelszíni enzimekre, valamint a protonok citoplazmába való beáramlása miatt a sejt belső pH-ja is lecsökken, károsodásokat okozva a fehérjék és a DNS szerkezetében, a baktériumok anyagcsere folyamataiban. A savas pH mellett jelentős károsító hatása van a képződő gyenge savak (tejsav, ecetsav, stb.) disszociálatlan molekuláinak is. Ezek a lipofil molekulák ugyanis könnyen átjutnak a plazmamembránon, és a citoplazmában disszociálódnak. A sejtbe beszivárgó, valamint a disszociáció során felszabaduló protonok feldúsulnak a citoplazmában és tönkreteszik a transzmembrán protongrádienszt (más néven proton-mozgató erőt), ami szükséges a különböző transzport folyamatokhoz, a mozgásképesességhez és az ATP-bioszintézishez. A baktériumok protonpumpák és ioncserélő csatornák segítségével, illetve negatív töltésű ionok felvételével igyekeznek helyreállítani a homeosztázisukat, azonban ezek ATP-t igénylő folyamatok, amelyek előbb-utóbb kimerítik a sejtek energiatartalékait [BOOTH & KROLL 1989]. Egyes szerves savak (pl. hangyasav, ecetsav) disszociációjakor nem csak a felszabaduló protonok

okoznak gondot, hanem a képződő anionok is, amelyek gátolják a baktériumok anyagcseréjét [CORLETT & BROWN 1980].

3.4.2. Hidrogén-peroxid

Oxigén jelenlétében a tejsavbaktériumok elektronokat visznek rá a molekulára, és ezáltal szuperoxid anion (O_2^-), hidrogén-peroxid (H_2O_2) vagy víz keletkezik. A hidrogén-peroxid erős oxidálószer lévén képes gátolni illetve elpusztítani a romlás- és kórokozó baktériumokat.

3.4.3. Bakteriocinek

A tejsavbaktériumok szerves savak termelése mellett fehérje természetű antimikrobás anyagok, ún. bakteriocinek termelésével is képesek gátolni más, elsősorban Gram-pozitív mikroorganizmusok növekedését, szaporodását. TAGG és munkatársai [1976] definíciója szerint a bakteriocinek fehérje jellegű vegyületek, amelyek közelrokon baktériumokat képesek elpusztítani. Bár ez a meghatározás a bakteriocinek többségére igaz, ismertek olyanok is, amelyek rendszertanilag távolabbi baktérium csoportok ellen is hatásosak, és a fehérje rész mellett lipid illetve szénhidrát komponenseket is tartalmaznak. A tejsavbaktériumok által termelt számos bakteriocint négy osztályba sorolják [KLAENHAMMER 1993]:

I. osztály: lantibiotikumok, kis membrán-aktív peptidek (<5 kDa), amelyek szokatlan aminosavakat, ún. lantioninokat (pl. β -metillantionin) tartalmaznak. Ide tartozik a lakticin 481, a laktocin S vagy a nizin.

II. osztály: kis, hőstabil, lantioninokat nem tartalmazó membrán-aktív peptidek (<10 kDa). Az ide tartozó bakteriocineket további három alosztályba (IIa, IIb, IIc) sorolják. Ide tartozik a pediocin PA-1, sakacin A vagy a leucocin A.

III. osztály: nagy, hő-labilis fehérjék (> 30 kDa). Ide tartozik például a helveticin J és a helveticin V-1829.

IV. osztály: összetett bakteriocinek, melyek a fehérje rész mellett lipid vagy szénhidrát részt is tartalmaznak. Ide sorolják a plantaricin S-t és leucocin S-t.

3.4.3.1. Nizin

A számtalan felfedezett tejsavbaktérium bakteriocin közül, a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* által termelt nizin az egyedüli, amelynek élelmiszer tartósítószerként való felhasználását a WHO engedélyezte. Azóta a világban több, mint 50 országban használják fel. Az Európai Közösségben a nizint a tartósítószernek között az E 234 szám jelöli.

A nizin gátló hatását *Lactobacillus bulgaricus*-szal szemben először ROGERS írta le 1928-ban. Azóta a nizin baktericid hatását számos Gram-pozitív baktérium ellen kimutatták, beleértve a legtöbb tejsavbaktériumot, a *Staphylococcus aureus*-t és a *Listeria monocytogenes*-t [BENKERROUM & SANDINE 1988]. A *Bacillus* és *Clostridium* fajok esetében a nizin nem csupán a vegetatív sejteket pusztítja el, de meggátolja a spórák kihajtását is. Gram-negatív baktériumokkal szemben a nizin hatástalan természetes körülmények között, azonban a külső membrán szétszakításával (fagyasztás, hőkezelés, sav, stb. [KALCHAYANAND et al. 1992]) vagy a lipopoliszacharid réteg keláló szerekkel (pl. EDTA) való meggyengítésével [STEVENS et al. 1991] ezek a baktériumok is érzékennyé tehetők.

A nizin egy 3488 Da nagyságú, 34 aminosavból álló hidrofób peptid, amely öt tioéter keresztkötést tartalmaz. A nizinnek két természetesen előforduló formája van, a nizin A és nizin Z, amelyek csupán egy aminosavban térnek el a 27. helyen. A fehérjét egy körülbelül 10 kilobázis nagyságú nizin operon kódolja, amely a strukúrgén mellett tartalmazza a prepeptidként szintetizálódó fehérje poszttranszlációs módosításában szerepet játszó enzimek, valamint nizin exportálásához szükséges transzport fehérjék génjeit is. Az operonban ezen kívül kódolódik egy, a nizin elleni védelemhez szükséges fehérje is, azaz a termelő törzs mindig rezisztens a saját bakteriocinjére [KLAENHAMMER 1993]. Érdekes módon a nizin-termeléssel és nizin-immunitással genetikai kapcsoltságban van a szacharóz fermentáció képessége is (nizin-szacharóz elem). Egyes tanulmányok szerint a nizin bioszintézis génjei plazmidon helyezkednek el, amit alátámaszt, hogy egyes törzsek képesek véglegesen elveszteni a nizin-termelő képességüket. Más szerzők ugyanakkor a nizin-szacharóz elem kromoszómán való elhelyezkedéséről számolnak be [STEEN et al. 1991]. Mások szerint azonban a nizin bioszintézis génjei egy 70 kilobázis nagyságú konjugatív transzpozonon található, ami kromoszómálisan helyezkedik el [RAUCH & DE VOS 1992].

A nizin vegetatív sejtekkel szembeni antimikrobás hatása abban rejlik, hogy a citoplazma membránba beépülve azon pórusokat hoz létre, amelyeken keresztül kiegyenlítődik a membrán potenciál felépítésében szerepet játszó ionok koncentrációja a membrán két oldalán, így megszűnik a proton grádiens, a protonmozgató erő. A nizin molekulák nem monomerként, hanem több molekula összekapcsolódásával alakítják ki a membránt átívelő csatornákat. A nizin hatását segíti a közeg savas pH-ja, hiszen a jelentősebb proton koncentráció különbség meggyorsítja a hidrogén ionok kiegyenlítődést a membrán két oldalán. A kisebb pH emellett azért is fontos, mert savas környezetben megnő a nizin oldhatósága és a stabilitása is (alkalikus pH-n a molekula inaktiválódik) [GARCERÁ et al. 1993]. A nizin a baktérium spórák kihajtását is képes meggátolni azáltal, hogy a fehérjében

található dehidro-aminosavak kölcsönhatásba lépnek a csírázó spórák membránjaiban lévő szulfhidril csoportokkal [MORRIS et al. 1984].

A tejsavbaktériumok által a környezetbe bocsájtott membrán-aktív bakteriocinek, így a nizin is [HENNING et al. 1986] – pH-függő módon – megkötődnek az érzékeny baktériumok sejtfalán [YANG et al. 1992], majd beljebb haladva beépülnek a citoplazma membránba. A bakteriocinra rezisztens baktériumok vagy meg sem kötik a bakteriocint [HURST 1981] vagy a megkötődő bakteriocinek továbbjutását a sejtfelszín védő funkciói akadályozzák meg. A nizin ellen védelmet biztosít például a Gram-negatív baktériumok számára a külső membrán vagy a termelő törzs számára a nizin operonban kódolódó védőfehérje (egy extracellulárisan elhelyezkedő lipoprotein).

A citoplazma membrán foszfolipid összetétele is befolyásolja a nizin beépülésének hatékonyságát [VENEMA et al. 1995]. A két- és háromértékű ionok például hozzákötődve a foszfolipidek negatívan töltött fej részéhez, semlegesítik azt és ezáltal a lipidek kondenzációját (sűrűsödését) eredményezik. A kialakuló rigidebb membrán csökkenti a nizin molekulák beépülésének és pórus képzésének hatékonyságát. A legnagyobb hatást a gadolínium ion (Gd^{3+}) esetében figyelték meg, amelynek hozzáadása a nizin Z pórusok bezáródását eredményezte. Hasonló hatás figyelhető meg alacsony hőmérsékleten, ami szintén a membránok rigidebbé válását okozza [ABEE et al. 1994]. Mivel a membrán fluiditás létfontosságú a membrán-folyamatok fenntartásához, a baktériumok szabályozzák a membránok foszfolipid-összetételét a hőmérséklet függvényében (hidegadaptáció) azáltal, hogy több telítetlen zsírsavat építenek a membránokba. Ennek köszönhető, hogy a nizin kis hőmérsékleten is hatásos marad.

A nizin az emberi szervezetre veszélytelen, mert elfogyasztása után gyorsan inaktiválódik a bélcsatorna emésztőenzimjei (α -kimotripszin) hatására.

3.5. Tejsavbaktériumok szerepe a fermentált élelmiszerek előállításában

A különféle erjesztett élelmiszerek előállítása több ezer éves múltra tekint vissza. Az Eufrátesz völgyében talált, i.e. 3000 körülről származó agyagtáblák tanúsága szerint, az ott élő népek már készítettek például sajtokat.

A tejsavas erjesztett termékek alapanyaga lehet tej, hús, zöldség vagy gabona, melyekből a fermentáció körülményeinek szabályozásával változatos élelmiszerek készíthetők. Az így készült termékek - a tejsavbaktériumok tevékenysége eredményeképpen - az alapanyaghoz képest biztonságosabbak, hosszabb ideig eltarthatók, tápanyagokban és ízanyagokban gazdagabbak, ugyanakkor antinutritív anyagokban szegényebbek lesznek. Ilyen élelmiszerek

a fermentált tejtermékek (pl. joghurt, kefir, vaj, sajtok), a fermentált húskészítmények (pl. szalámi- és kolbászfélék), az erjesztett zöldségfélék (pl. savanyú káposzta, uborka, olívabogyó) vagy a savanyú kovászos kenyér.

Az erjesztés a kezdetekben spontán fermentációval történt, az alapanyagban lévő vagy a környezetből véletlenszerűen belekerülő baktériumok segítségével. Ezt a módszert alkalmazzák ma is a zöldségfélék erjesztésénél. Később a korábbi erjesztésből megmaradt baktériumtömeg továbboltásával igyekeztek azonos minőségű terméket létrehozni. A mikroorganizmusok a folyamatos átoltással való fenntartás során alkalmazkodtak a különböző alapanyagokhoz, így ezekben jól és gyorsan tudtak elszaporodni. A baktériumok felfedezése és a mikrobiológiai módszerek fejlődése tette lehetővé a fermentációban részt vevő fajok megismerését, pontos jellemzését és ezen ismeretek birtokában indítótenyészetek, vagy más néven starter kultúrák kifejlesztését. A starterkultúrák egy vagy több tejsavbaktérium keverékét tartalmazzák meghatározott mennyiségben [DEÁK 2006]. Egyes termékek esetében nem-tejsavbaktériumokat (pl. élesztőket, penészeket) is tartalmaz a starter kultúra. Az indítótenyészetben lévő, genetikailag stabil törzseket olyan szelekciós kritériumok alapján választják ki, mint a gyors savanyító képesség, bakteriofág rezisztencia, ízanyagok képzése, bakteriocin termelés képessége, stb. [CHAMPOMIER-VERGÉS et al. 2002]. Tekintve, hogy az élelmiszer fermentációkban részt vevő tejsavbaktérium fajokat hosszú ideje biztonságosan használják fel, ezért a GRAS (Generally Recognised As Safe) azaz „általánosan biztonságosnak ismert” kategóriába sorolják őket.

3.6. Tejsavbaktériumok szerepe az élelmiszer tartósításban

3.6.1. Az élelmiszer tartósítás új kihívásai

Az ENSZ Mezőgazdasági és Élelmezési Szervezete (a FAO) becslése szerint szerint világátlagban az élelmi anyagoknak legalább egynegyede veszendőbe megy ma is. Az élelmi anyagok romlástól való megóvása ezért elsőrendű gazdasági kérdés valamennyi ország számára.

Évezredek fejlődés eredményeként, tapasztalati alapon számos hagyományos élelmiszer-tartósítási eljárás (pl. szárítás, sózás, fagyasztás, pácolás, füstölés, fermentálás, hőkezelés) alakult ki, amelyek alkalmazásával az élelmiszerek hónapokig, sőt esetenként évekig biztonságosan eltarthatóvá tehetők. Az ezekkel a módszerekkel tartósított élelmiszerek hosszú időn keresztül kielégítették a fogyasztói igényeket. A 20. század közepétől azonban új kihívások is jelentkeztek: a fogyasztók – főként az életszínvonal javulása, a megváltozott életstílus és a táplálkozás-tudományi ismeretek terjedése révén – azt is igénylik, hogy az

élelmiszerek az eddigieknél „természetesebb” állapotban, kevesebb vegyi adalékanyaggal, jobb érzékszervi minőséggel, ugyanakkor kényelmes formában és kevésbé szezonális jelleggel jussanak el hozzájuk.

Az eltarthatóság mellett az élelmiszerek biztonságos, az egészséget nem veszélyeztető volta is alapkövetelmény az élelmiszertermelésben. Az elmúlt évtizedek élelmezés-egészségügyi statisztikái az ételmérgezési, ételfertőzési problémák növekedését mutatják, elsősorban a patogén mikroorganizmusokkal való szennyeződés miatt. Ennek kiváltó okai részben az új kórokozó mikrobák (pl. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 szerotípus, *Salmonella* Enteritidis alfaj, *Campylobacter* fajok) megjelenésében keresendő, részben a fogyasztók fogékonyságának növekedésében, amelyeknek háttérében szocio-ökonómiai, demográfiai és globalizációs tényezők állnak. Ilyen tényezők például a nagyobb élelmiszer-szennyeződési lehetőség a tömegtermelés és hosszabb élelmiszer láncok miatt, a fogyasztók nagyobb „kitettsége” a városiasodás, a tömeges helyváltoztatás és megnövekedett nemzetközi kereskedelem miatt, vagy a csökkent ellenállóképesség a népesség előregedése és általában az immunszupresszált népességhányad növekedése miatt [FARKAS 2002].

Az új kihívásokra, azaz hogy a termék egyszerre legyen biztonságos és „természetes” állapotú, az élelmiszeripar új megközelítések és eljárások kifejlesztésével igyekszik választ találni. Olyan új, kíméletes tartósító technológiák („minimal processing”) vannak kidolgozás, továbbfejlesztés illetve gyakorlati bevezetés alatt, mint például a nagy hidrosztatikus nyomás (HHP), a pulzáló elektromos térerő (PEF), a pulzáló nagyintenzitású fény vagy az ultrahang. Az új technológiák mellett növekvő szerepet kapnak a természetes antimikrobás anyagok is [GOULD 1996]. Mivel a kíméletes módszerekkel általában csak kisebb mértékű pusztító hatás érhető el, a biztonságos tartósító hatás elérése érdekében, ezeket más eljárásokkal kombinálva használják.

3.6.2. A kombinált tartósítás gát elve

Kombinált tartósítás esetén két vagy több tényezőt együttesen alkalmaznak olyan mértékben, amelyek külön-külön csak részleges mikrobagátlást fejtenének ki, de együttesen teljesebb gátlást, biztonságosabb tartósságot eredményeznek. A tényezők együttes hatása lehet összeadódó (additív), vagy ennél nagyobb (szinergens). Az élelmiszerben lejátszódó folyamatot az ún. gát elvvel lehet megközelíteni, melyet Lothar Leistner vezetett be a 1980-as években, és amelynek alkalmazásáról részletes összefoglaló mű jelent meg [LEISTNER & GOULD 2002]. A gát hasonlat szerint a mikroorganizmusoknak több tartósító tényező (pl. hőkezelés, pH, sókoncentráció, tárolási hőmérséklet) gátján kell átjutni ahhoz, hogy a

termékben elszaporodjanak vagy életben maradjanak. Minél több gát van, annál kisebb a mikroba túlélésének valószínűsége.

3.6.3. Tejsavbaktériumok a gát elméletben

A tejsavbaktériumok, különböző anyagcsere tevékenységeik révén, hozzájárulnak az élelmiszer-eredetű romlás-, és kórokozó baktériumok aktivitásának visszaszorításához. A különböző antimikrobás hatások egy időben, kombinációban érvényesülnek, ezért a gyakorlatban nem választhatók el egymástól.

3.6.3.1. Versengő mikroflóra

A tejsavbaktériumok - melyek a starter kultúrák alkalmazása révén már beoltáskor több nagyságrenddel nagyobb koncentrációban vannak jelen az alapanyagban, mint a káros mikroorganizmusok - eredményesen versengenek a tápanyagokért, így teremtve kedvezőtlen körülményeket számukra [PITT et al. 2000]. Azokban az esetekben, amikor az erjesztett termékeket spontán fermentációval állítják elő (pl. számos zöldségféle), az alapanyag felületén lévő, majd a fermentációt végző epifita mikroorganizmusok képesek versengő mikroflóraként viselkedni. COOLEY és munkatársai [2006] kimutatták, hogy ez esetben azok az epifita mikrobák sikeresek, amelyek ugyanazt a szénforrást hasznosítják, mint a patogén. FARKAS és munkatársai [2002] eredményei ugyanakkor arra mutatnak rá, hogy a tejsavbaktériumok gátló hatása, a tápanyag kimerülése mellett, szignál-molekulák termelődésével is magyarázható. A szignál-molekulák felhalmozódnak a nagy populáció sűrűség esetén és a káros mikrobák stacioner fázisba kerülését eredményezik.

3.6.3.2. pH, savak és hidrogén-peroxid

A starter kultúra gyors savanyító képessége elsőrendű fontosságú szempont a fermentált élelmiszerek előállításánál, minthogy az elégtelen savtermelés, és az ebből adódó lassú pH csökkenés hozzájárulhat a termékben lévő káros baktériumok felszaporodásához. Tejtermékek esetében a pH a 3,7-4,4 tartományba kerül a tejsavbaktériumok anyagcseréje folytán, ami jó mikrobiológiai biztonságot és hosszú eltarthatósági időt eredményez. A fermentált húskészítményekben a pH csökkenés ugyan kisebb mértékű (kb. pH 5,2), azonban a termékekben lévő egyéb gátló anyagok (NaCl, Na-nitrit, fűszerek, stb.) segítségével ezek a termékek is jó minőségűvé és biztonságossá válnak [DEÁK 2006]. Egy tanulmány arról számol be, hogy egyes starter kultúrák pH-tól független módon gátolták pszichrotrof baktériumok szaporodását. A tejsavbaktériumok védő hatása kataláz hozzáadására megszűnt,

ami arra utal, hogy a gátlás a hidrogén-peroxidnak tulajdonítható [GILLILAND & SPECK 1975, JUFFS & BABEL 1975].

3.6.3.3. Bakteriocinek

Tekintettel arra, hogy a tejsavbaktériumokat széles körben használják fel starter kultúrákban, elsősorban az általuk termelt bakteriocinek azonosítása, vizsgálata és gyakorlati alkalmazhatósága felé fordult a tudományos érdeklődés. A bakteriocinek bejuttatása a termékbe több módon is megvalósítható. A termék beoltható a bakteriocin-termelő törzssel, amely lehet a starter kultúra része, de lehet kifejezetten a bakteriocin-termelésért felelős ún. védőkultúra is. A bakteriocin hozzáadható a termékhez tisztított vagy részben tisztított formában. Végül, a bakteriocin bevihető bakteriocin-termelő törzssel készült adalékanyag hozzáadásával is.

Annak ellenére, hogy bakteriocinek élelmiszer tartósítószerként való felhasználása számos nehézségbe ütközik, a szerzők többsége mégis olyan biotartósítószereket lát bennük, amelyek megfelelő alternatívát kínálhatnak a hagyományos kémiai tartósítószerekkel szemben. Ezek a biológiai tartósítási módszerek várhatóan kedvező fogadtatásra találnak majd a fogyasztók körében, pl. a nitrit, a szorbát vagy a benzoát kiváltása esetén [SCHILLINGER et al. 1996]. Ugyanakkor a bakteriocinek alkalmazásának nehézségei is vannak. A tisztított formában való alkalmazásnak gátat szab, hogy a kereskedelmi forgalomba kerülés előtt az új bakteriocin biotartósítószert engedélyeztetni kell a FAO/WHO élelmiszer adalékokért felelős szervénél. Ugyancsak megnehezíti a tisztított bakteriocinek elterjedését relatíve nagy előállítási költségük is [PARENTE & RICCIARDI 1999]. Végül hátrány, hogy a bakteriocinek „single-hit” mechanizmus szerint hatnak [TAGG et al. 1976], azaz miután ellátták feladatukat irreverzibilisen inaktiválódnak, így a kezelést túlélő populáció ismét felszaporodik. Előnyösebb ezért a tejsavbaktériumok in situ bakteriocin termelése, amelyhez plusz biztonsági faktorként hozzájárul a tejsavbaktériumok savtermelése is. Figyelembe kell azonban venni, hogy a bakteriocinek elsősorban a közelrokon fajok ellen hatnak, így a starter kultúra egyéb tagjait is gátolhatják [ENNAHAR et al. 1998]. Ennek kivédése érdekében a starter baktériumok összeférhetőségét előzetesen tesztelni kell.

A legtöbb tanulmány szerint a bakteriocinek hatása a célmikrobára csak „mérsékelt” vagy „korlátozott” (általában 1-3 log egység csökkenés). Ennek hátterében több tényező is áll. A termelő törzs hatékonyságát csökkenthetik: 1. az élelmiszerben uralkodó kedvezőtlen körülmények (pl. pH, hőmérséklet, tápanyagok), 2. bakteriofág fertőzés, 3. a bakteriocin-képző képesség spontán elvesztése, 4. a jelenlévő antagonista mikroorganizmusok. A bakteriocin hatékonyságát csökkenthetik: 1. a rossz oldékonyság és az egyenlőtlen eloszlás az

élelmiszer mátrixban, 2. a pH hatása a bakteriocin stabilitására és aktivitására, 3. az élelmiszer komponensein (pl. zsír részecskéken, fehérjéken) való megkötődés, 4. a bakteriocin biológiai aktivitását károsító folyamatok (pl. proteázok, oxidációs folyamatok) valamint 5. bakteriocin-rezisztens célmikrobák megjelenése [SCHILLINGER et al. 1996]. A kisebb mértékű pusztító hatás miatt a bakteriocinek tehát nem használhatók egyedüli tartósítószerként, azonban jól beilleszthetők a gát elméletbe. Meg kell jegyezni, hogy a bakteriosztatikumokkal szemben, amelyek csak gátolják a mikroba szaporodását, a bakteriocinek baktericid gátként is szolgálnak, így hozzájárulnak az érzékeny mikrobák vegetatív sejtszámának csökkentéséhez [MURIANA 1996].

Azaz, mint egyetlen engedélyezett mikrobiális tartósítószer, több hagyományos és új, kíméletes tartósító eljárással együtt alkalmazták már sikeresen. Megnövekedett gátló hatást eredményezett, ha a nizin más bakteriocinnel [HANLIN et al. 1993], vagy a tej laktoperoxidáz rendszerével [RODRÍGUEZ et al. 1997] együtt alkalmazták Gram-pozitív baktériumok vegetatív sejtjeivel szemben. Szinergens hatást találtak a nizin és egy növényi eredetű antimikrobás anyag, a karvakrol [POL & SMID 1999] valamint a nizin és a PEF kezelés [POL et al. 2000] között *Bacillus cereus* vegetatív sejtjein, viszont a spóráin nem [POL et al. 2001]. WANDLING és munkatársai [1999] arról számoltak be, hogy a nizin érzékenyebbé tette a *Bacillus cereus* és *Bacillus stearothermophilus* spórákat a hőkezelésre. Más szerzők [BEUCHAT et al. 1997, JAQUETTE & BEUCHAT 1998] pedig a hűtő-hőmérséklet kedvező hatását írták le nizzinnel való kombináció esetén.

3.7. Tejsavbaktériumok és a biofilm

3.7.1. A baktérium biofilmek jelentősége az élelmiszeriparban

A mikroorganizmusok szinte minden felület-típuson képesek megtapadni, így jól kolonizálják az élelmiszer-feldolgozó üzemek nedves, rendszerint szerves anyagokkal borított felületeit is (pl. fa, acél, üveg, csempe, műanyagok, feldolgozandó nyersanyagok) [BECZNER 2001]. A helyhez kötött baktériumok kedvező körülmények között gyorsan elszaporodnak, és vastag bevonatot ún. biofilmet képeznek. A mikroba sejtek közé gyakran nagy mennyiségű szerves és szervetlen törmelék is berakódik.

A biofilmek jelenléte és működése lehet hasznos, például a biológiai ecetgyártásban és a szennyvíztisztításban, azonban komoly gazdasági és higiéniai problémákat is okozhatnak a gyógyszeriparban és az élelmiszeriparban. Hőcserélőkön és hűtőtornyok felületein képződő biofilmek energia veszteséget okoznak, mivel a megtelepedő baktériumok csökkentik a hőátadás hatékonyságát. Energia veszteséget jelent a csővezetékek belső falán kialakuló

biofilmek áramlást akadályozó hatása is, amely végső esetben a csövek eldugulásához vezet. A biofilm képes eltömíteni a szűrőrendszereket is, ezáltal nagyban csökkenteni a membránok átteresztőképességét. A biofilmek anyagcsere aktivitása, elsősorban szulfát-redukáló és savtermelő baktériumok tevékenysége által, a fémfelületek korróziójához, majd gyors előregedéséhez, kilyukadásához vezet [KUMAR & ANAND 1998].

A biofilmekben megtelepedő, majd onnan leváló romlás-, és kórokozó baktériumok ugyanakkor állandó fertőzési forrást képeznek az élelmiszer-előállító üzemekben, ezáltal termékvesztést és élelmiszer-biztonsági problémákat okoznak a feldolgozott termékben. Ezt támasztják alá MIETTINEN és munkatársai [1999] eredményei is, akik hét éven át folyamatosan izolálták ugyanazt a *L. monocytogenes* törzset egy fagyalt üzemből, míg a nyersanyagból nem tudták kimutatni a mikrobát.

A biofilmképzés gyakori esemény a mikrobák világában, mivel a biofilmben való élet többféle előnnyel jár a baktériumok számára: védelmet biztosít, a sejtek közelsége miatt gyakrabban fordul elő horizontális géntranszfer, több fajtól álló biofilmekben melléktermék/végtermék hasznosítási kapcsolatok alakulnak ki a fajok között, stb. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a biofilmben élő sejtek sokkal rezisztensebbek az antimikrobás kezelésekkel szemben is (pl. fertőtlenítő szerek, savak, bakteriocinek, hő), mint a planktonikus sejtek [MORTON et al. 1998].

Ebből adódik, hogy mind gazdasági, mind higiéniai szempontból a biofilm létrejöttének megakadályozása a cél. Ennek érdekében elengedhetetlen megismerni a biofilm kialakulásának mechanizmusát és működésének törvényszerűségeit.

3.7.2. A baktérium biofilmek kialakulása és szerkezete

A biofilm felszínhez kötődő sejtegyüttes, amely irreverzibilisen kötődik a felülethez azáltal, hogy a saját maga által termelt extracelluláris polimer mátrixba (extracellular polymer substances, EPS) merül. Kialakulása a sejtek reverzibilis megtapadásával kezdődik, ami az EPS termelődésével párhuzamosan válik irreverzibilissé. A felszínhez tapadó sejtek növekednek, osztódnak és további sejteket is megköthetnek a környezetből: mikrokolóniák képződnek. A mikrokolóniák tovább növekedve, majd aggregálódva alakítják ki az érett biofilmet. A biofilm lehet csupán egy vastag, homogén sejtmassza, de lehet összetett szerkezetű, oszlopokból és közöttük lévő vízcsatornákból álló sejtegyüttes is. A vízcsatornák a tápanyagnak a biofilm belsejében lévő sejtekhez való eljutásában, valamint a végtermékek kijuttatásában van szerepük.

Az érett biofilm dinamikus rendszer, melyben a sejtek növekednek, osztódnak, elpusztulnak, leválnak, illetve felszint kínálnak további sejtek megtapadásához [CHAVANT et al. 2002]. A biofilm képzés utolsó fázisa az, amikor a helyhez kötött sejtek visszatérnek planktonikus állapotba. A sejtek szétterjedése bekövetkezhet osztódás után a leánysejtek leválásával, vagy kisebb darabok szakadhatnak le a biofilmről az áramlás hatására. Ritkábban a biofilm teljes leválása is bekövetkezik, amit a közeg jellemző paramétereinek drasztikus megváltozása vált ki (pl. hirtelen pH-csökkenés, tápanyagkimerülés, oxigénhiány). Ha egy sejt számára kedvezőtlené válnak a szaporodási/anyagcsere körülmények és van rá lehetősége, elhagyja biofilmet. A biofilm belsejében lévő sejtek erre általában már nem képesek és elpusztulnak. A leválást kiváltó környezeti szignálok ez esetben a tápanyaghiány, az oxigénhiány, a quorum sensing (a sejtek közötti szignálmolekulákkal történő kommunikáció), stb. A sejtnek, hogy el tudjon szakadni a biofilmtól, el kell bontania a körülötte lévő EPS-t, és aktiválnia kell a mozgásfunkcióit [DONLAN 2002].

3.7.3. A baktériumok felszínhez tapadását befolyásoló tényezők

Egy mikrobacejt megtapadását számos különböző tényező határozza meg, beleértve (1) magát a mikrobát, (2) a felszint és (3) a közeget - mivel a kitapadás mindig folyadékközegben, tehát nedves felületeken történik (2. ábra).



2. ábra: A baktériumok megtapadását befolyásoló legfontosabb tényezők (az illusztráció eredete: [Montana State University honlapja])

3.7.3.1. A mikroorganizmus tulajdonságai

A mikroba esetében meghatározó a taxonómiai csoport: a felszínhez tapadás nem csak faj szinten, de törzs [GORSKI et al. 2004], sőt szerotípus szinten is eltéréseket mutat. NORWOOD & GILMOUR [1999] tanulmánya szerint *L. monocytogenes* esetében például az 1/2c a legjobban tapadó szerotípus. Ez az eredmény meglepőnek tűnhet, mivel az élelmiszer-fertőzésekben leggyakrabban az I. osztályba tartozó 4b szerotípus fordul elő, ezzel szemben a II. osztályba tartozó 1/2a és 1/2c szerotípus csak ritkán izolálható.

A legutóbbi évek molekuláris mikrobiológiai eredményei bizonyították, hogy környezeti szignálok - illetve az általuk kiváltott génexpresszió változások - szabályozzák, vajon egy baktérium megtapad-e egy felszínen vagy nem, valamint hogy ez a szabályozás eltér a különböző fajokban. Valószínűleg ez teszi lehetővé, hogy egy-egy faj a számára ideális környezetet tudja kolonizálni. A közeg tápanyag ellátottsága is egyike a környezetből érkező, a felszínhez tapadást befolyásoló szignáloknak. Éhezés hatására a mikrobák jobban kitapadnak (mivel a felszínhez adszorbeálódnak a tápanyagok), a teljes tápanyag hiány azonban negatív szignál [STANLEY & LAZAZZERA 2004].

A felületet elérő baktérium kezdeti, reverzibilis kötődését különböző fiziko-kémiai kölcsönhatások határozzák meg. Ezek közül a legfontosabbak a Lewis-féle sav-bázis kölcsönhatások, az elektrosztatikus, valamint a van der Waals (hidrofób) kölcsönhatások. A baktériumsejt felszíne jellegzetesen negatívan töltött, azaz elektron-donor felszín, ami a sejt falban jelenlévő számtalan foszfát- és karboxil csoport miatt alakul ki. BRIANDET és munkatársai [1999] leírják, hogy például a *L. monocytogenes* Scott A törzs esetében $1,5 \times 10^{-3}$ M NaCl oldatban, pH 2 és 7 között nem lehetett meghatározni az izoelektromos pontot, ami arra utal, hogy a sejt felszínén lévő vegyületek pK_a -ja nagyon kicsi. (A teichoinsavak foszfodiészter hídját alkotó foszfát csoportok pK_a -ja kisebb, mint 2,1.) A mikrobiális kolonizáció szempontjából tehát a elektron-akceptor (bázikus) felszínnek a kedvezőek. Ez azonban nem jelenti azt, hogy az elektron-donor felszíneken, mint amilyen pl. a rozsdamentes acél, ne telepednének meg a baktériumok. A két negatívan töltött felszín között fellépő elektrosztatikus taszítóerőket a Lewis-féle sav-bázis és van der Waals kölcsönhatások, valamint a sejt felszínén lévő különböző struktúrák segítenek legyőzni.

A felülethez tapadásban részt vevő sejt felszíni struktúrák a flagella, a fimbriák és a pilusok, valamint a glikokalix. A flagella segíti a baktériumot, hogy eljusson a felszínhez, és segít legyőzni a fellépő taszító erőket, forgó mozgása azonban hosszú távon már gátolhatja a tapadást. VATANYOOPAISARN és munkatársai [2000] eredményei szerint a flagellának csupán a tapadás kezdetekor van szerepe, hosszú távon (24 óra elteltével) már nincs. Ekkor ugyanis más sejt felszíni struktúrák működnek közre a tapadásban. A fimbriák közül a

leginkább tanulmányozott az enterális baktériumok ún. I-es típusú fimbriája, amellyel specifikusan képesek kötni a gazda bélhámsejtjeinek glikoproteinjeit. CHIGO [2001] az F pilust (konjugációs pilus) vizsgálta, és azt találta, hogy szerepet játszik nemcsak a sejt-sejt, de a sejt-felület adhézióban is, így hozzájárul a három-dimenziós biofilm kialakulásához az *Escherichia coli*-nál. A *Listeria monocytogenes* egyes törzsei rendelkeznek glikokalixszal (poliszaharid tok), amely a virulenciával kapcsolatos, és ugyancsak szerepet játszik a felülethez tapadásban.

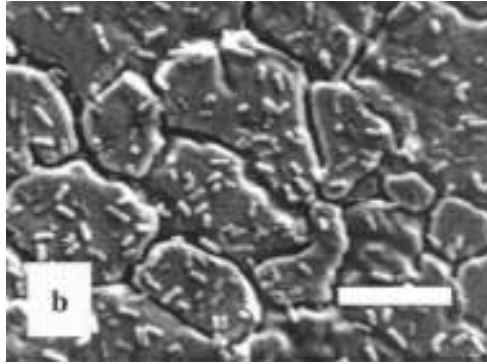
A sejt felületén lévő molekulák mennyisége és minősége (akár a sejt felszínen akár valamely sejt felszíni struktúrán helyezkednek el) tehát együttesen határozzák meg a baktérium különböző felszínekhez való tapadóképességét. Ebből adódóan bármilyen változás következik be a molekuláris összetételben, az kihathat a tapadásra is. Ilyen változás például, hogy a sejt az exponenciális növekedési fázisból stacionárius fázisba kerül, vagy a hőmérséklet-csökkenés hatására bekövetkező hidegadaptáció.

Egy felszín sikeres mikrobiális kolonizációja szempontjából nem elhanyagolható a mikrobák koncentrációja, azaz hogy hány baktérium éri el a felszínt, valamint a kitapadási idő hossza sem. A kitapadási idő különösen hosszúra nyúlhat a nehezen takarítható helyeken, pl. tömitéseknél, szelepeknél, csuklórészeknél, stb.

3.7.3.2. A felszín tulajdonságai

A felszínek jellemzői közül alapvető fontosságú azok hidrofób/hidrofil, illetve elektron-donor/elektron-akceptor jellege, mert ez jelentősen befolyásolja a baktérium kezdeti, különböző fiziko-kémiai kölcsönhatásokon alapuló reverzibilis kötődését.

A mikrobák megtelepedése szempontjából lényeges tulajdonság a felszín barázdáltsága is. A durvább felszíneket a mikrobák jobban kolonizálják, mert a barázdáltság miatt egyrészt megnövekszik a tapadási felület, másrészt pedig csökkennek a baktériumra ható nyíró erők [ARNOLD & BAILEY 2000]. A rozsdamentes acél például – amelyet széles körben használnak az élelmiszeripari üzemek munkafelületeinek, berendezéseinek kialakításakor – bár első ránézésre simának tűnik, az elektronmikroszkópos képen látható, hogy mikrobarázdákkal sűrűn tagolt a felszíne (3. ábra). Ha az acél felszínét sérülések, karcok érik, a keletkezett felületi hibák tovább növelik a kedvező tapadási helyek számát.



3. ábra: Rozsdamentes acél felülete tapadó *L. monocytogenes* 399 törzssel (Pásztázó elektronmikroszkópos felvétel, a vonal 3 μm -t jelöl) [KALMOKOFF et al. 2001]

A baktériumok felülethez tapadását rendszerint megelőzi, hogy a folyadékközegből szerves polimerek (pl. hidrolizált fehérje, poliszaharidok) adszorbeálódnak a felszínhez. Ezek a továbbiakban elősegítik, esetenként gátolják a mikrobák megtapadását. Ha a folyadékközegből hiányzik a tápanyag, a felszínhez kötött szerves anyag pozitív válaszreakciót vált ki a baktériumokban, amelyek elindulnak a nagyobb ozmolaritású hely felé és ott megtapadnak. A szerves polimerekkel borított felszínek általában a felületi töltés szempontjából is kedvezőbbek. Például a húslével kezelt rozsdamentes acél felülete kevésbé negatív, mint a tiszta acél felületé, így a baktériumok könnyebben tudnak hozzá tapadni [ZOTTOLA & SASAHARA 1994]. Ugyanakkor HELKE és munkatársai [1993] azt tapasztalták, hogy sovány tejjel vagy β -laktoglobulinnal előkezelt rozsdamentes acél felülethez kevésbé tapadnak a *L. monocytogenes* és *Salmonella typhimurium* sejtek. A jelenség magyarázatára McGUIRE [1989] javasolt egy modellt: a megkötött fehérjék ebben az esetben egyensúlyi állapotban vannak a folyadékban lévő fehérjékkel, ezért további részecskék – pl. mikrobák – már nem tudnak kitapadni.

Az adszorbeált polimerek mellett más mikroba-fajok is segíthetik, illetve gátolhatják a baktériumok megtapadását. SASAHARA & ZOTTOLA [1993] arról számol be, hogy a *L. monocytogenes* önmagában gyenge biofilm képző, ezért más, elsődleges biofilm képző fajokra (pl. *Pseudomonas* spp.) van szüksége, hogy azok tapadási felületet kínáljanak számára. NORWOOD & GILMOUR [2001] eredményei ugyanakkor azt mutatják, hogy a *L. monocytogenes* Scott A jobban tapad egyedi tenyészetben, mint *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 illetve *Staphylococcus xylosum* DP5H törzsek jelenlétében, mivel ilyenkor versengenie kell a többi fajjal. CARPENTIER & CHASSAING [2004] 29 élelmiszeripari izolátum jelenlétében vizsgálta a *L. monocytogenes* tapadását rozsdamentes acélhoz; ezek közül 16 törzs szignifikánsan gátolta, 4 törzs pedig szignifikánsan segítette a *Listeria* tapadását.

3.7.3.3. A közeg tulajdonságai

A közeg tapadást befolyásoló jellemzői közül a legfontosabbak a hőmérséklet, a pH és a tápanyag ellátottság. Ezen faktorok mindegyike hatással van a baktérium növekedési sebességére, így a biofilm növekedési ütemére. Ezen kívül befolyásolják az EPS képzést és a fibrillumok/flagellák szintézisét is.

A *L. monocytogenes* esetében például a flagella szintézise hőmérséklet függő: 20-25°C között motilis (peritrich flagellát szintetizál), 35°C felett nem motilis (csak néhány flagellája van) [PEEL et al. 1988]. Emellett újra meg kell említeni a hőmérséklet csökkenés hatására bekövetkező hidegadaptációt, amely a sejtfelszín molekuláris összetételének megváltozásával jár, és emiatt szintén befolyásolhatja a baktériumok adhéziós képességét. (A hidegadaptáció a baktériumok sejtmembrán szerkezetének átalakulását jelenti, ami a membrán fluiditásának fenntartása érdekében következik be.)

A pH a már felsoroltakon kívül hatással van a sejtfelszíni vegyületek töltöttségére is: pH csökkenés hatására ugyanis protonálódnak a sejt felszínén lévő karboxil, foszfát és más anionos csoportok. Mivel a protonálódás semlegesíti a sejtfelszín töltöttségét befolyásoló csoportokat, a sejtek hidrofobitása növekszik [PELLETIER et al. 1997].

A közeg nem megfelelő tápanyag ellátottsága általában olyan környezeti szignál, amire a baktérium a felülethez való kitapadással válaszol, mivel a felhasználható tápanyagok is rendszerint a felszínhez kötődnek. A környezetben fellelhető tápanyagok emellett azt is meghatározzák, hogy milyen jellegű és mennyiségű EPS-t tud a baktérium szintetizálni.

A biofilm által termelt EPS szerepe többértű. Az egyik legfontosabb funkciója, hogy a felszínhez rögzíti a mikroorganizmusokat. Az EPS emellett nagy mennyiségű vizet képes megkötni hidrogén kötésekkel, ezáltal megóvjá a baktériumokat a kiszáradástól. Az EPS ezen kívül megköthet fémionokat, makromolekulákat (fehérjéket, zsírokat, nukleinsavakat), agyag/iszap szemcséket, korróziós részecskéket, stb. is. Az EPS szerkezetét elsősorban a poliszacharidok összetétele és konformációja határozza meg, ezáltal befolyásolja a biofilm merev/könnyebben formálható, oldható/oldhatatlan jellegét. A rezisztenciában ugyancsak nagy szerepe van az EPS-nek [DONLAN 2002].

3.7.4. Biofilm elleni védekezés

A baktériumok tapadásának és biofilm képzésének törvényszerűségeit megismerve, a biofilmek kialakulása jobban megelőzhető, illetve a meglévő mikrobiális bevonatok eltávolítása hatékonyabban megvalósítható. Ezáltal a biofilm okozta veszélyek kockázata csökkenthető.

Az élelmiszer-előállító sorok átgondolt tervezésével (szétbontható, jól takarítható berendezések használata, a csővezetékben a folyadékok pangásának megelőzése, stb.), jó minőségű, sima, kopásálló anyagok alkalmazásával és a nedves felületek kiküszöbölésével a biofilm képződés problémája nagyrészt megelőzhető. A mikrobák megtelepedését ezen kívül akadályozza a különböző ipari felületek vagy csomagoló anyagok antimikrobás szerekkel történő impregnálása, átítatása is.

Ismert tény, hogy a baktériumok a tapadás kezdetén csak reverzibilisen kötődnek a felszínhez, ezért ebben a fázisban még viszonylag könnyen, kis energiabefektetéssel eltávolíthatóak. Ezért van nagy jelentősége a napi takarítási rutin betartásának – főleg azokon a helyeken, ahol potenciálisan biofilm képződéssel számolhatunk. A reverzibilis tapadás az EPS termeléssel válik irreverzibilissé. A biofilm képződés ezen fázisában a sejtek már sokkal nehezebben távolíthatóak el és nő az antimikrobás kezelésekkel szembeni rezisztenciájuk.

A már kialakult biofilmek eltávolítása megoldható fizikai, kémiai vagy biológiai eljárásokkal, illetve ezen módszerek kombinálásával. A fizikai módszer esetében a hagyományos mechanikai tisztítás mellett olyan újabb módszerek is felhasználhatóak, mint az ultrahangos kezelés, a pulzáló elektromos mező vagy a gyengeáram (200-400 μ A). A kémiai eljárások esetében tisztító (detergensek) és fertőtlenítő szerek (perecetsav, klóros fertőtlenítők, hidrogén-peroxid, stb.) egymást követő alkalmazása távolítja el hatékonyan a biofilmet [PAP et al. 2006]. A legújabb módszerek a bioaktív vegyületek, mint pl. a bakteriocinek, enzimek felhasználásában rejlik, valamint történtek vizsgálatok a kompetitív mikroba-fajok hatásának vizsgálatára is [KUMAR & ANAND 1998].

A szorgos és rendszeres takarítás megelőzi a mikrobiális bevonatok képződését az élelmiszerrel érintkező felületeken, az élelmiszerrel nem érintkező – és emiatt ritkábban vagy kevésbé hatékonyan takarított – felületeken (pl. padló, falak, lefolyók) azonban már kialakulhatnak és problémákat okozhatnak a biofilmek. Ezeken a helyeken akár évekig is életben maradhatnak a mikroorganizmusok, és az aeroszolba kerülve folyamatos fertőzési forrást jelenthetnek [ZOTTOLA & SASAHARA 1994]. Egy-egy üzemben jelenlévő, többé-kevésbé stabil mikrobaközösség, az ún. „házi mikroflóra”, amely jellemző az adott üzemre. Egy élelmiszeripari üzem házi flórájának, azaz autochton mikrobiótájának jelentős befolyása van arra, hogy egy patogén mikroorganizmus, pl. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. meg tud-e telepedni az üzemben [CARPENTIER & CHASSAING 2004]. COSENTINO és PALMAS [1997] hat, juhsajt előállító kis, helyi tejüzem mikrobiológiai állapotát vizsgálta és megállapította, hogy – bár az üzemek rossz higiéniai állapotúak voltak – sosem lehetett *Listeria* vagy *Salmonella* fajokat izolálni. ZHAO és munkatársai [2004] *Listeria monocytogenes*-mentes élelmiszer üzemekből izolált mikroorganizmusokat és az izolátumok

között 24 anti-lisztériás hatású törzset talált. Kórokozó baktériumok megtelepedésének megakadályozására ezért egy lehetséges megoldás lehet a patogének más, biztonságos baktériumokkal való kizárása az élelmiszerelőállító üzemekből. A kompetitív mikrobafajok által okozott gátló hatások a kötőhelyekért és tápanyagokért való versengés, az antimikrobás anyagok és a gátló hatású EPS termelése.

3.7.5. Biofilmek vizsgálatának lehetőségei és nehézségei

A felületekhez tapadó mikroorganizmusok vizsgálatára, az egyszerű gyorstesztektől a bonyolult mikroszkópos technikákig, számos módszer kínálkozik azok minden előnyével és hátrányával. Az élelmiszer-feldolgozó üzemek felületeinek higiéniai állapotáról, vagy a takarítás hatékonyságáról gyors eredményt ad az ATP-kimutatáson alapuló luminometriás módszer. Figyelembe kell azonban venni, hogy a felületen ATP-tartalmú szennyeződések (pl. növényi részek) is lehetnek, emiatt a módszer fals eredményt adhat a biofilmről [DE ROSA et al. 1998]. Kvantitatív eredményt szolgáltatnak a felületi mintavételt követő tenyésztéses eljárások. A mintavétel történhet a táplemez felülethez való érintésével közvetlenül, vagy a felület tamponos letörése után. Erősebben kötődő biofilmek esetében vortexelésre vagy a felszíni réteg lekaparására lehet szükség [KUMAR & ANAND 1998]. A tenyésztéses módszer esetében azonban több jelentős probléma is felmerülhet: (1) a mintavétel során nem sikerül eltávolítani valamennyi mikrobát a felületről, (2) a mikrobák egy része elpusztul az eltávolítás (pl. üvegyöngyös vagy ultrahangos lerázás) során [WIRTANEN et al. 1996], (3) a sejtek nagy része nem nő ki a táptalajon, mert holt, sérült vagy élő, de nem kitenyészthető (viable but non culturable, VBNC) állapotban van [CHAE & SCHRAFT 2001]. Különböző felület-vizsgáló mikroszkópos technikák is használhatók biofilmek tanulmányozására, bár ezek a módszerek nem használatosak rutin-szerű mérésekre az élelmiszer-feldolgozás során. Fluoreszcens festéssel [KALMOKOFF et al. 2001] vagy jelöléssel [GORSKI et al. 2004] láthatóvá tett biofilmek vizsgálatára az epifluoreszcens mikroszkópia alkalmas. Érett biofilmek esetében ugyanakkor gondot jelent, hogy a festékek nem jutnak el a mélyebb sejtrétegekbe illetve az EPS köti meg az azokat. A vastag, több rétegből álló biofilmek háromdimenziós vizsgálatára a konfokális lézer szkennning mikroszkópia (CLSM) nyújt lehetőséget [NEU et al. 2001]. A felületek nagy felfelbontású letapogatására az atomi erő mikroszkópia (AFM) és a pásztázó elektronmikroszkópia (SEM) [ARNOLD & BAILEY 2000] a legalkalmasabb módszerek. Az utóbbi három technika azonban rendkívül költséges berendezéseket és nagy szakértelmet igényel, így sok kutató számára nem elérhető.

3.8. Tejsavbaktériumok, mint probiotikumok

3.8.1. A probiotikum definíciója

A probiotikumok olyan mikroorganizmusok vagy mikrobiális sejtalkotók, amelyek – megfelelő mennyiségben fogyasztva – jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségi állapotára és közérzetére [SALMINEN et al. 1999]. Ezek a mikroorganizmusok lehetnek csupán átmeneti lakói is a gyomor-bél rendszernek, azonban elengedhetetlen szempont a jótékony egészségi hatás, amelyet tudományos kísérletekkel kell alátámasztani. A fenti definíció igen átfogó módon határozza meg a probiotikumokat, hiszen egyaránt kiterjed az emberi és állati szervezetben való alkalmazásokra, a bélmikrobióta mellett a test más részein – pl. a hüvelyben – élő mikrobiális közösségek egyensúlyának helyreállítására, az egyedi és kevert tenyészetek valamint az élő mikrobák mellett holt sejtek vagy sejtalkotók felhasználására is.

A disszertáció további részében a probiotikum elnevezést az emberi gyomor-bél rendszer egészségének megőrzésében és helyreállításában szerepet játszó, élő mikroorganizmusokra fogom használni.

3.8.2. A probiotikumok felfedezése

A „tejsavképző” mikroorganizmusok pozitív szerepét a bélcsatorna mikrobiális egyensúlyának megőrzésében már a múlt század fordulóján feltételezték a kor mikrobiológusai. Az erjesztett tejtermékekben élő tejsavbaktériumok egészség-megőrző szerepére a párizsi Pasteur Intézetben dolgozó, orosz származású tudós Ilja Mecsnyikov hívta fel a figyelmet. Mecsnyikov összefüggésbe hozta a Kaukázusban és a Balkánon élő népek magas átlagos élettartamát rendszeres, nagy mennyiségű tejtermék-fogyasztással. Megfigyeléseit azzal magyarázta, hogy a tejtermékek tejsavbaktériumai gátolják a káros rothasztó, toxintermelő baktériumok tevékenységét a bélben, csökkentve egyes betegségek kockázatát [HOLZAPFEL & SCHILLINGER 2002, SZAKÁLY 2004].

A probiotikumokkal kapcsolatos kutatások a 20. század utolsó két évtizedében lendültek fel ismét, ami elsősorban a vizsgálómódszerek (pl. DNS technikák) gyors fejlődésének volt köszönhető. A kutatások több szálon indultak el:

1. a gyomor-bél rendszer mikrobiótájának megismerése (faji diverzitás, a mikrobióta eloszlása az egyes bélszakaszokban, időbeli változásai, stabilitása, kölcsönhatása a gazdaszervezettel, stb.),

2. törzsselektálás: lehetséges probiotikus törzsek keresése (a természetből, tejtermékekből illetve a bélcsatornából izolált törzsek vizsgálata tekintettel probiotikus és technológiai tulajdonságaikra, in vitro tesztek kidolgozása, törzstulajdonságok szabványosítása),
3. jelölt probiotikus baktérium törzsek vizsgálata in vivo állatkísérletekben és humán klinikai vizsgálatokban, lehetséges egészségi hatások vizsgálata, a jótékony hatás meglétének bizonyítása, a napi dózis meghatározása,
4. a jótékony hatások mögött húzódó élettani-biokémiai folyamatok megismerése.

A kiterjedt kutatásoknak köszönhetően ma már számos probiotikus mikroba törzset ismerünk, ezek többsége a tejsavbaktériumok közé tartozik. Ezeken kívül néhány nem-tejsavbaktérium (pl. *Bacillus cereus* 'toyoi', *Escherichia coli* 'Nissle 1917') és élesztő (pl. *Saccharomyces cerevisiae* 'boulardii') törzset ismertek el probiotikumként [HOLZAPFEL et al. 1998]. A probiotikus törzsek jelentős része valamely szakterületi világcég tulajdona és szabadalmi védelem alatt áll. A *Lactobacillus*-ok közül például a *Lb. casei* Shirota a japán Yakult, *Lb. rhamnosus* GG a finn Valio, a *Lb. casei* Immunitas a Danone cég tulajdona [SZAKÁLY 2004].

3.8.3. Az emberi gyomor-bél rendszer mikrobiótája

Az ember bélcsatornáját - a gyomortól a vastagbélig - komplex mikrobaközösség népesíti be. Becslések szerint a felnőtt béltraktus összesen százbillió (10^{14}) mikroba sejtet tartalmaz, ami tízszer több mint az emberi szervezetet alkotó sejtek száma. A mikroorganizmusok nem egyenletesen oszlanak el a bélcsatorna különböző szakaszaiban: a gyomorban és a patkóbélben viszonylag kicsi a csíraszám (10^1 - 10^4 /g béltartalom), amit az itt uralkodó kedvezőtlen körülmények, a gyomorsav, az emésztőenzimek és az epe mikrobagátló hatása valamint a béltartalom rövid tartózkodási ideje magyaráz. A vékonybél alsóbb szakaszaiban folyamatosan nő a csíraszám (10^4 - 10^8 /g béltartalom), ami a vastagbélben, a mikrobák számára legkedvezőbb bélszakaszban, 10^{10} - 10^{12} /g béltartalom sejtszámot ér el [HOLZAPFEL et al. 1998]. Ezt a bonyolult ökoszisztémát egyes becslések szerint ezernél több mikrobafaj alkotja. Ezek között vannak egyértelműen hasznosak, mint az *Eubacterium*, *Bifidobacterium* és *Lactobacillus* nemzetségekhez tartozó fajok, és károsak (megbetegedést okozók), mint például a *Pseudomonas aeruginosa*, vagy a *Proteus*, a *Clostridium*, a *Staphylococcus* nemzetség fajai. Emellett vannak esetileg károsak vagy hasznos és káros tulajdonságokat egyaránt mutató „kétarcúak”, mint pl. az *Escherichia coli*, és a *Bacteroides*, az *Enterobacterium*, az *Enterococcus*, és a *Streptococcus* nemzetségek fajai. A bélmikrobióta

tagjai között kis számban mindig jelen vannak káros mikroorganizmusok is, de ezek addig nem veszélyesek a gazdára nézve, míg egy meghatározott csíraszám alatt maradnak. A bélmikrobióta szoros kölcsönhatásban él a gazdaszervezettel és annak számos élettani-biokémiai folyamatában közreműködik.

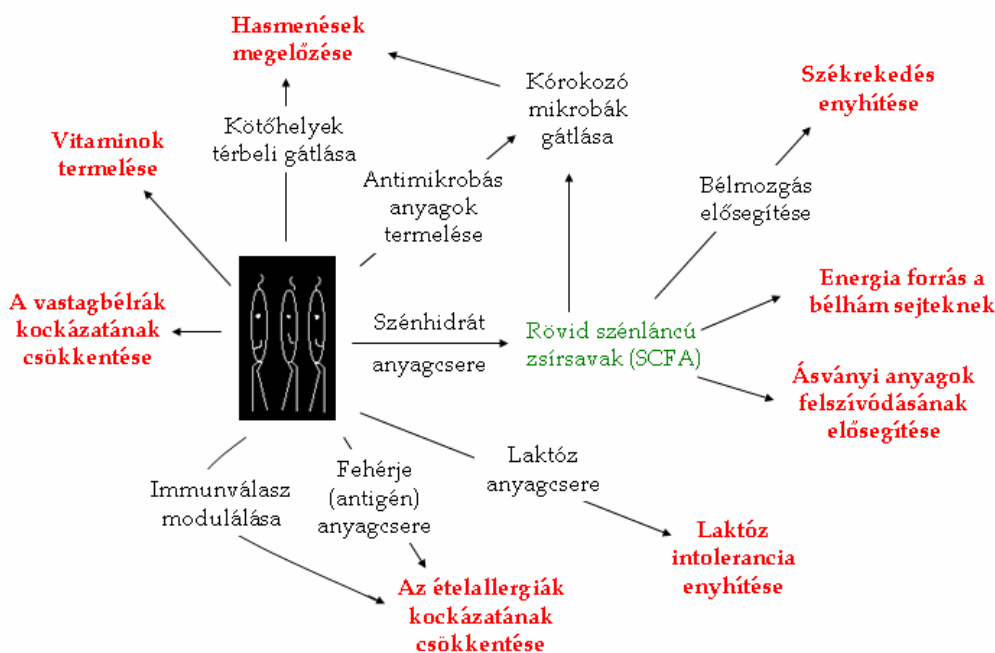
A bélmikrobióta egyénre jellemző [LAY et al. 2005], amely már a születés után elkezd formálódni [POLGÁR 2004]. Összetételét és eloszlását a gazdaszervezet élettani jellemzői (azaz közvetve a genotípusa [ZOETENDAL et al. 2006]), a mikroorganizmusok tulajdonságai, a bélcsatorna és a mikrobák illetve a mikrobák közötti kölcsönhatások, valamint a környezeti faktorok együttesen alakítják ki. Az élettani jellemzők közül fontosak pl. a bél lumenébe kiválasztott anyagok (enzimek, savak, immunglobulinok), a bélmozgás intenzitása és más tulajdonságok. A mikrobiális jellemzők között a bélfalhoz való tapadás képessége, a tápanyag-ellátottság változásaihoz való alkalmazkodó képesség vagy a kitartó képletek (pl. spórák) képzésének képessége lehet fontos szempont. A különböző mikroorganizmusok között szinergista (egymást segítő) és antagonistá (egymást gátló) kölcsönhatások egyaránt létrejöhetnek. A hasznos csoportba sorolt *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajok, pl. szerves savak és más, specifikus antimikrobás vegyületek termelésével tudják visszaszorítani számos kórokozó baktérium szaporodását [HOLZAPFEL et al. 1998]. Mint a fentiekből is látszik, a bélmikrobióta egyensúlyát kölcsönhatások szövevényes hálózata alakítja ki. Bár ez az egyensúly az egészséges felnőttekben stabil [ZOETENDAL et al. 1998], egyes külső körülmények (pl. fertőzések, gyógyszeres kezelés – főként antibiotikumok –, egyoldalú táplálkozás, ésszerűtlen fogyókúra) vagy belső változások (az öregedés, az immunrendszer meggyengülése, stresszes állapot, a bél nyálkahártyagátjának sérülései, stb.) hatására felborulhat és a káros mikroorganizmusok irányába tolódhat el. Ezek a mikrobák kellemetlen bélrendszeri tüneteket, megbetegedéseket okozhatnak, az általuk termelt toxinok illetve fekális enzimek – melyek rákkeltő vegyületek képződését katalizálják – hozzájárulhatnak a vastagbélrák kialakulásához.

3.8.4. Probiotikus törzsek tulajdonságai

A bélmikrobióta egyensúlyának helyreállítása, valamint a különböző bélrendszeri megbetegedések megelőzése, gyógyítása érdekében a hasznos mikrobák felé kell eltolni a bélmikrobióta összetételét. Ez elősegíthető probiotikumok – megfelelő mennyiségben történő – fogyasztásával. Tekintettel arra, hogy a bélmikrobióta egy óriási faji diverzitású és csíraszámában is jelentős méretű ökoszisztéma (3.8.3. fejezet), a bevitt hasznos mikrobák csak egy bizonyos csíraszám felett képesek benne változásokat előidézni. Becslések szerint

napi 10^9 - 10^{11} db probiotikus baktériumot kell elfogyasztani a jótékony hatás elérése érdekében [FONDÉN et al. 2003]. Egy probiotikum sikeressége azonban nem csak a csíraszámom múlik, általános mikrobiológiai, technológiai és funkcionális kritériumoknak egyaránt meg kell felelniük. Kulcsfontosságú mikrobiológiai feltétel, hogy a törzs biztonságos legyen, emellett fenotípusosan és genetikailag stabil, valamint jó sav- és epetűréssel rendelkezzen, ami biztosítja számára a túlélést a felsőbb bélszakaszokon való áthaladás során. A technológiai tulajdonságok közül fontos szempont, hogy a probiotikus törzs képes legyen alkalmazkodni egy megfelelő szállítóhoz vagy fermentálható szubsztráthoz (pl. a tejhez), ne okozzon kellemetlen érzékszervi tulajdonságokat, és életképességét illetve anyagcsere aktivitását megtartsa az eltarthatósági idő végéig.

A funkcionális tulajdonságok, a bélhámhoz való tapadás képessége, az antimikrobás anyagok termelése és az immunogén jelleg, az egészségre gyakorolt jótékony hatások kifejtéséhez szükségesek [TUOMOLA et al. 2001]. A klinikai hatások mögött húzódó élettani-biokémiai mechanizmusok azonban sok esetben még nem ismertek illetve nem bizonyítottak, hiszen a megfigyelések részben a korlátozott számú in vivo vizsgálatokból, részben az in vitro sejtenyészeteken végzett modell kísérletekből származnak [HOLZAPFEL et al. 1998].



4. ábra: A probiotikumok jótékony hatásai

A probiotikumok tudományosan bizonyított élettani hatásai elsősorban a bél mukóza gátjának megerősítésével és az immunválasz módosításával kapcsolatosak [SALMINEN et al. 1996], melyet úgy érnek el, hogy (1) helyreállítják a bélmikrobióta egyensúlyát, (2) a kötőhelyek elfoglalása által gátolják a kórokozók (baktériumok, vírusok, gombák) kitapadását és aktivitását, (3) az élelmiszer eredetű fehérjék módosítása által csökkentik illetve megszüntetik

azok allergén jellegét, (4) módosítják a tumorok kialakulását indukáló bakteriális enzimeket, (5) befolyásolják a mukóza áteresztőképességét (4. ábra).

3.8.5. Prebiotikumok

A bélcsatorna hasznos mikrobiotájának arányát nem csupán kívülről bevitt probiotikus baktériumokkal lehet növelni, hanem a már betelepült baktériumok növekedésének, szaporodásának serkentésével is. Ez megvalósítható az ún. prebiotikumok fogyasztásával. A prebiotikumok (korábbi néven bifidogén faktorok) olyan, a gazda számára emészthetetlen élelmiszeralkotók, amelyek szelektíven serkentik a vastagbélben jelen lévő, hasznos mikrobacsoportok szaporodását és/vagy aktivitását [GIBSON & ROBERFROID 1995]. A prebiotikumok legfontosabb csoportjai: a rezisztens keményítő, a nem-keményítő poliszacharidok (pl. pektin, cellulóz, hemicellulóz, guarumi) illetve egyes cukrok és oligoszacharidok (pl. laktóz, laktulóz, raffinóz, frukto-oligoszacharidok). A prebiotikumokhoz hozzá lehet jutni természetes úton különböző élelmiszerekből: sok gyümölcs- és zöldségféle tartalmaz például frukto-oligoszacharidokat (hagyma, póréhagyma, banán, csicsóka, stb.), azonban gyakran nem akkora mennyiségben, amely elegendő a pozitív hatások kifejtéséhez. Ezért van nagy jelentősége a különböző élelmiszerek prebiotikumokkal való kiegészítésének [GIBSON 2004]. A pro- és prebiotikumokat egyaránt tartalmazó termékekben a kedvező hatások összeadódnak, ezek a termékek a szinbiotikumok.

3.8.6. Adhézió

A legtöbb élettani hatás kiváltásához szükséges, hogy a probiotikum megkötődjön a bélhámsejtek felszínén. A megtapadás az első lépés afelé, hogy a törzs kolonizálja, vagy legalábbis átmenetileg kolonizálja a bélcsatornát [SALMINEN et al. 1996]. A tapadás folyamatának kezdeti lépése egy aspecifikus, azaz fiziko-kémiai kölcsönhatásokon alapuló kötődés, amit egy specifikus – a baktérium felületén lévő adhéziós molekulák (adhezinek) és a epitheliális sejtek receptorainak összekapcsolódásával megvalósuló – adhézió követ [MIRON et al. 2001]. Probiotikus baktériumok kiválasztása során ezért meg kell vizsgálni a törzsek bélhámsejtekhez való tapadóképeségét, amely laboratóriumi körülmények között emberi bélhámából származó szövettenyészetek felhasználásával valósítható meg.

3.8.7. Tapadásteszt

Az in vitro tapadás-vizsgálatokban általánosan alkalmazott humán sejtvonalak a Caco-2 és a HT-29 jelű vonal, valamint az utóbbi nyálkát termelő változata, a HT-29-MTX. Bár mindkét sejttípus vastagbél karcinómából származik, mégis felhasználhatók a tapadás tesztekben, mivel differenciálódott bélhámsejtekre jellemző tulajdonságokat mutatnak. In vivo a bélhámsejtek lumen felé eső (apikális) felszínét nyálka borítja, ami védi a sejteket a mechanikai károsodásoktól és az enterális kórokozóktól. Mivel ezzel a réteggel találkoznak először az elfogyasztott baktériumok, a nyálkához való tapadás képessége is fontos lehet a mikrobiális kolonizáció szempontjából. A sejttenyészetek mellett ezért a tapadás tesztekben székletből izolált nyálkán [KIRJAVAINEN et al. 1998] valamint a nyálkából kivont glikoproteineken [TUOMOLA et al. 1999, OUWEHAND et al. 2000] is végeznek vizsgálatokat.

A Caco-2 sejt vonal poszt-konfluens állapotban (összenövés után) spontán módon a vékonybél felszívó bélhámsejtjeihez hasonló polarizált, kefeszegéllyel rendelkező enterocitákká differenciálódik. Morfológiai differenciációjára utal a fejlett kefeszegély, valamint a sejtek között a szoros sejtkapcsolatok (tight junctions) megléte, amelyek a polarizált nyálkahártyákra jellemzőek. A funkcionális differenciáció a sejtek növekedésével párhuzamosan alakul és a sejtek enzimaktivitásainak változásaival követhető nyomon. Az in vitro sejttenyészetekben megfigyelhető struktúrális és funkcionális differenciáció hasonló a bélben lejátszódó érési folyamathoz, ezért ez a sejt vonal megfelelő modellje az emberi bélhámnak [PINTO et al. 1983].

A tapadásteszt célja tehát megállapítani, hogy a bélhámsejt-tenyészethez adott baktériumok milyen mértékben képesek megkötődni a sejtek felszínén. Annak ellenére, hogy az új törzsek probiotikus potenciáljának megállapítása szempontjából elengedhetetlen a tapadási képesség vizsgálata, az irodalomban nem található standardizált vizsgálati módszer, a protokollok egyes paraméterei kutatócsoportról kutatócsoportra változnak. Az egyes törzsekre vonatkozó eredmények ezért jelentős különbségeket mutathatnak. Tekintettel arra, hogy ezek az in vitro kísérletek csupán modellezik a bélcsatornában uralkodó körülményeket, ezért egyik protokoll sem ajánlható teljes bizonyossággal és egyik törzs tapadóképességéről sem adható meg abszolút tapadási érték [BLUM et al. 1999]. Ezért az egyes kísérleti beállításokban a tapadási képességet egy nem-tapadó törzs (negatív kontroll) tapadásához viszonyítva kell meghatározni.

3.8.8. Detektálási módszerek

A bélhámsejt tenyészet felületén megtapadó baktériumok detektálására és kvantifikálására több módszert közöl az irodalom. A módszerek főbb előnyeit és hátrányait az 1. táblázatban foglaltam össze. A megfelelő módszer kiválasztása a tesztelni kívánt törzsek tulajdonságai, a tapadásteszt körülményei és a laboratóriumban elérhető eszközök alapján történik.

1. táblázat: Bélhámsejtek felületéhez tapadó baktériumok detektálására alkalmas módszerek, valamint azok előnyei és hátrányai [LE BLAY et al. 2004, VESTERLUND et al. 2005]

| Módszer | Előnyök | Hátrányok |
|---|---|---|
| Gram-festés + mikroszkópos számlálás | <ul style="list-style-type: none"> Egyszerű | <ul style="list-style-type: none"> Nem különbözteti meg az azonos Gram-csoportba tartozó baktériumokat Fáradtságos és időigényes Szubjektív (baktérium aggregátumok) Nagy szórás (gyakran baktérium/100 sejtre adják meg) |
| + képanalízis | <ul style="list-style-type: none"> Egyszerű és gyors | <ul style="list-style-type: none"> Digitális kép szükséges Csomókat egybeszámolja |
| Lemezöntés | <ul style="list-style-type: none"> Nagyon érzékeny (log 3 kimutatható) Nem igényel speciális felszerelést Sejten belüli kórokozók kimutatására (pl. <i>Salmonella</i> spp.) is használható | <ul style="list-style-type: none"> Munka- és anyagigényes Ha csomókban tapad a baktérium, alábecsüli a számukat Szelektív táptalajokat igényel Feltételezi, hogy az összes tapadó baktérium kitenyészthető |
| Radioaktív jelölés | <ul style="list-style-type: none"> Pontosabb és egyszerűbb, mint a sejtszámlálás és a lemezöntés Érzékeny és reprodukálható Kevert tenyészeteknél is alkalmazható | <ul style="list-style-type: none"> Speciális kísérleti körülményeket igényel (izotóp-labor) cpm arány (counts-per-minute) nem stabil Élő/holt sejteket nem különíti el |
| ELISA | <ul style="list-style-type: none"> Kényelmes Nagy kísérletekben, sok törzs tesztelésakor is használható | <ul style="list-style-type: none"> Ellenanyag beszerzése probléma lehet (specifikusság) Keresztreakció előfordulhat Roszul tapadó baktériumoknál nem megfelelő (háttérzaj) Élő/holt sejteket nem különíti el |
| Fluorimetria | <ul style="list-style-type: none"> Kevert tenyészeteknél is alkalmazható Biztonságos (radioaktív jelölés kiváltására) | <ul style="list-style-type: none"> A fluoreszcens jelölés megváltoztathatja a baktérium felszínét/életképességét Roszul tapadó baktériumoknál nem megfelelő (háttérzaj) Kevésbé érzékeny, mint a radioaktív jelölés |

3.9. Élelmiszer-eredetű romlás-, és kórokozó baktériumok

Ebben a fejezetben csak az általam a kísérletekben használt mikrobákat ismertetem.

3.9.1. *Pseudomonas* fajok és a *Pseudomonas fluorescens*

A *Pseudomonas* nemzetség a – Gram-negatív baktérium csoportokat egyesítő – *Proteobacteria* törzs gamma osztályába tartozik. A pszeudomonászok aerob, kataláz-pozitív, jellemzően oxidáz-pozitív, pálcá alakú, poláris ostorral mozgó baktériumok, kemoorganotróf anyagcserét folytatnak és semleges körüli pH-n növekednek a mezofil hőmérséklet tartományban. Egyes fajaik hűtőhőmérsékleten is képesek szaporodni. Tápanyag ellátás szempontjából rendkívül igénytelenek: növekedésükhöz nem igényelnek növekedési faktorokat, vitaminokat, ugyanakkor a szerves vegyületek széles skáláját képesek felhasználni szén- és energiaforrásként. Egyes fajok 100-nál is több vegyületet képesek hasznosítani. Ezek között az egyszerű szénhidrátokon, zsírsavakon, aminosavakon kívül sok olyan vegyület is van (pl. szénhidrogének, szteroidok, kondenzált gyűrűs heterociklusos vegyületek), amelyeket kevés más mikroorganizmus tud lebontani. Ezért a mineralizációban, szénkörforgalomban aktív szerepet töltenek be. Másrészt viszont a pszeudomonászokból általában hiányoznak a hidrolázok, ezért nem képesek a polimer molekulák monomerekre való lebontására. Anyagcseréjükben fakadóan széles körben elterjedtek a természetben, talajban, vizekben, sőt több növényi és állati kórokozó is van közöttük. Gyakran okozzák élelmiszerek, elsősorban zöldségek, húsok és húskészítmények romlását. A *Pseudomonas* nemzetség több faja termel egy sárgászöld, vízben oldható fluoreszcens festékanyagot, amely UV fényben fluoreszkál (pl. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) [DEÁK 2006].

A *P. fluorescens* pszichrofil baktérium, ezért képes a hűtött termékeken is elszaporodni, és azokban romlást előidézni. Ritkán kórokozó, mivel 37°C-on nem szaporodik jól [MADIGAN et al. 2003].

3.9.2. *Bacillus* fajok és a *Bacillus cereus*

A *Bacillus* nemzetség a Gram-pozitív baktériumok *Firmicutes* törzsébe tartozik, ahova a kis G+C tartalmú csoportokat sorolják. A *Bacillus*-ok jellemző tulajdonsága az endospóra képzés. Az endospóra egy különleges szerkezetű, inaktív állapotú baktérium sejt, amely kedvezőtlen körülmények között képződik a vegetatív sejten belül (majd szabaddá válik). Szerkezetéből adódóan rendkívüli módon ellenáll a kedvezőtlen környezeti tényezőknek (pl. nagy hőmérséklet, kiszáradás, kémiai behatások). A *Bacillus* nemzetség egy élettani és ökológiai

szempontból is heterogén mikroba csoport: vannak köztük kemolitotróf és kemoorganotróf, fakultatív és obligát aerob, pszichrofil és termofil valamint acidofil és alkalofil fajok is. Számos szerves vegyület oxidációjára képesek, több faj a szénhidrátok erjesztésére is képes. A monomerek mellett a polimer molekulákat is hasznosítják (a különböző fajok pl. a kazeint, a keményítőt, a pektineket, vagy a cellulózokat hidrolizálják). Sokoldalú anyagcsere képességük folytán széles körben elterjedtek a természetben, elsősorban a talajban, melynek anyagkörforgalmában alapvető szerepet játszanak. Néhány *Bacillus* faj kórokozó (pl. *B. anthracis*), de még ezek a fajok is elsősorban talajlakó mikroorganizmusok, amelyek véletlenszerűen fertőzik meg a gazdaszervezeteket. Az endospóra képzés képessége nagy előnyt jelent számukra a túlélésben, minthogy a talaj egy igen változékony környezet, mind a tápanyag ellátás, mind a hőmérséklet vagy a vízáktivitás szempontjából [MADIGAN et al. 2003].

Sok *Bacillus* faj általánosan előfordul nyers- és feldolgozott élelmiszerekben. Ezek között különös jelentőséggel bír a *B. cereus*, mert élelmiszer-mérgezési tünetekkel járó megbetegedést okoz. A baktérium feltételes kórokozó, az infekció dózisa 10^5 sejt vagy spóra/g [DEÁK 2006]. A *B. cereus*, mint élelmiszer-eredetű kórokozó, az 1950-es évek óta ismert. A baktérium két különböző enterotoxint termel. Ezek egyike – egy nagy molekula tömegű, hőlabilis fehérje – hasmenéssel járó megbetegedést okoz, amely nagyon hasonlít a *Clostridium perfringens* okozta megbetegedés tüneteire. A másik toxin – egy kis hőstabilis peptid – hányással járó ételmérgezést okoz. Ennek tünetei a *Staphylococcus aureus* által okozott megbetegedés tüneteire hasonlítanak. A hasmenéses megbetegedést, elsősorban nagy számú baktérium elfogyasztása, a hányással járó tüneteket az élelmiszerben lévő toxin okozza. A *B. cereus* főként gabonafélékben, zöldségekben, tejtermékekben, húskészítményekben, keményítő tartalmú termékekben (pl. főtt rizs) fordul elő [DOYLE 1988].

Jelentős élelmiszer-biztonsági problémát okozhat a baktérium endospóra képző képessége is, annak ellenére, hogy a baktérium csak relatíve magas csíraszám esetén okoz megbetegedést. A hőkezelést (pl. pasztörözést) túlélő spórák ugyanis gyorsan kicsíráznak a szobahőmérsékleten hagyott élelmiszerben, majd a baktériumok elszaporodnak és néhány órán belül elérik a kritikus csíraszámot. A mezofil törzsek elszaporodása megakadályozható az élelmiszer hűtésével. A *B. cereus*-ok között azonban előfordulnak pszichrotrof törzsek is, melyek képesek tovább szaporodni és toxinokat termelni hűtőhőmérsékleten ($<7^{\circ}\text{C}$) [DUFRENNE et al. 1995].

3.9.3. *Listeria* fajok és a *Listeria monocytogenes*

A *Listeria* nemzetséget – akárcsak a *Bacillus*-okat – a *Firmicutes* törzsben találjuk, a Gram-pozitív, kis G+C tartalmú baktériumcsoportok között. A *Listeria* nemzetségbe pálca alakú, spórátlan, kataláz-pozitív baktériumok tartoznak. Filogenetikailag a *Lactobacillus* fajokhoz állnak közel, azonban míg azok aerotoleráns anaerobok, addig a lisztériák fakultatív aerobok [DEÁK 2006]. Hasonlóan a *Lactobacillus* fajokhoz, képesek a tejsavas erjesztésre, azonban glükózból nem képeznek gázt.

A ma ismert hét *Listeria* faj közül csak a hemolitikus fajok kórokozók: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*. A két utóbbi faj azonban csak ritkán okoz megbetegedést emberben. Ezzel szemben a *L. monocytogenes* által okozott liszteriózis súlyos, és az esetek 25-30%-ában halálos kimenetelű megbetegedés, amely elsősorban gyerekekre, idősekre, legyengült immunrendszerű betegekre és várandós anyákra veszélyes. Bár a liszteriózis enterális úton kapott fertőzés, a tünetek elsősorban nem itt, hanem a gyomor-bél rendszeren kívül jelentkeznek. A baktériumok a bélhámsejteken áttörve megfertőzik a fagocita sejteket, elszaporodnak bennük és a vérrel szétterjedve általános szepszist, agyhátyagyulladást, terhes anyáknál vetélést okozhatnak, valamint a szívet és a szemet károsíthatják.

A *L. monocytogenes* széles körben megtalálható a természetben (talaj, víz, szennyvíz, növényzet, stb.) és gyakorta izolálható különböző élelmiszer-feldolgozó üzemekből is. A környezetben való túlélését segíti, hogy rendkívül ellenálló a kedvezőtlen környezeti tényezőkkel szemben: széles hőmérsékleti (1-50°C) és pH (4,0-9,5) tartományon belül képes szaporodni, valamint elviseli a 10 %-os sókoncentrációt, a fagyasztást és a szárítást is. A *L. monocytogenes* átvivője leggyakrabban valamilyen fertőzött tejipari termék (nyers tej, sajt, fagylalt) vagy húskészítmény, de előfordulnak tojás, hal, zöldség okozta fertőzések is. Bár a baktérium széles körű elterjedtsége miatt a fertőződés esélye nagy, az akut liszteriózis csak ritkán és sporadikusan fordul elő [MADIGAN et al. 2003]. A kialakult liszteriózis magas halálozási rátája valamint a baktérium pszichrofil jellege miatt azonban a *L. monocytogenes* ellen zéró tolerancia van érvényben, ami azt jelenti, hogy az élelmiszer nem tartalmazhat egyetlen élő baktériumot sem [LOVETT & TWEDT 1988].

3.9.4. Az *Enterobacteriaceae* család és az *Escherichia coli*

Az *Escherichia coli* az *Enterobacteriaceae* család tipikus képviselője. Ez a család – nevének megfelelően – az enterális (bél) baktériumok csoportjait egyesíti, egy filogenetikailag relatíve homológ csoportot alkotva a *Proteobacteria* törzs gamma osztályán belül. Az enterális baktériumok Gram-negatív, spórát nem képző, mozdulatlan vagy peritrich ostorral mozgó

rövid pálcák. Fakultatív anaerob, oxidáz-negatív baktériumok. Aerob légzéssel többféle szerves vegyületet (szénhidrátokat, szerves savakat, aminosavakat) képesek hasznosítani, sőt gyakran polimerek (pl. keményítő, pektin, fehérjék) lebontására is képesek. Anaerob körülmények között számos mono- és diszacharidot tudnak erjeszteni. Két jellemző erjesztési mintázat fordul elő: a vegyes savas erjedés (pl. *Escherichia coli*) és a butándiolos erjedés (pl. *Enterobacter* spp.). Az enterális baktériumok különböző fajait hagyományosan fenotípusos bélyegek alapján különböztetik el (pl. indol, metilvörös, ureáz, Voges-Proskauer tesztek, stb). A gyorsan elvégezhető fenotipikai teszteknek fontos szerepe van a klinikai diagnosztikában, mivel az *Enterobacteriaceae* családban számos kórokozó baktérium is előfordul. A faji szintű azonosítás mellett különösen fontos az izolátumok szerológiai azonosítása is, amely a felületi antigének (sejtfal lipopoliszacharidok, ostor fehérjék, tokanyagok) besorolása alapján történik [DEÁK 2006].

Az *Escherichia coli* az ember és a melegvérű állatok vastagbelének jellemző lakója. Fontos szimbióta baktériumnak tekinthető, mivel részt vesz egyes vitaminok, elsősorban a K-vitamin termelésében. Emellett, mint fakultatív anaerob baktérium hozzájárul az oxigén elfogyasztásához, ezáltal az anaerob környezet megteremtéséhez, amely kritikus környezeti feltétel az obligát anaerob bélbaktériumok (pl. *Bifidobacterium* spp.) számára. Az *E. coli* törzsek többsége tehát ártalmatlan bélbaktérium, azonban számos patogén törzs is ismert, amelyek súlyos hasmenéses megbetegedéseket és húgyúti fertőzéseket okoznak. A patogén törzseket – elsősorban az általuk termelt endotoxinok és az okozott megbetegedés típusa alapján – speciális csoportokba sorolják, pl. enteropatogén *E. coli* (EPEC), enteroinvazív *E. coli* (EIEC), enterotoxigén *E. coli* (ETEC), enterohemorragiás *E. coli* (EHEC).

Mint jellegzetes bélbaktérium, az *E. coli* megjelenése a fekális szennyeződés fő indikátora. Az *E. coli*-val való fertőződés veszélye ezért csökkenthető a megfelelő higiéniai körülmények és vízminőség fenntartásával, és az előírásoknak megfelelő élelmiszer-kezelés betartásával [MADIGAN et al. 2003].

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Baktériumtapadás vizsgálata rozsdamentes acélon

4.1.1. Mikroorganizmusok

Vizsgálataimhoz a következő baktérium törzseket használtam fel: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Pseudomonas fluorescens* III P 13a, *Listeria monocytogenes* LM6. A törzseket a Nottingham-i Egyetem Élelmiszertudományi Osztályán (Division of Food Sciences, The University of Nottingham, Nottingham, Anglia) izolálták. A tejsavbaktérium a „nyarmié” nevű, Ghánában fogyasztott fermentált tejtermékből származik és azonosítása az API 50 CHL teszt (BioMérieux, Marcy l’Etoile, Franciaország) segítségével történt. A *Lactobacillus* törzset 20% glicerinnel kiegészített De Man, Rogosa, Shape táplevesben (MRS, Oxoid, Basingstoke, Anglia) tartottam fenn -20°C -on. A *P. fluorescens* törzset egy félkész élelmiszereket gyártó üzemből izolálták az osztály munkatársai, a törzs azonosítását az API 20NE teszttel (BioMérieux) végezték el. A *L. monocytogenes* törzs a 4b szerotípusba tartozik és tejből izolálták. A *Pseudomonas fluorescens* és *Listeria monocytogenes* törzseket egyaránt Brain Hearth Infusion táptalajon (BHI, Oxoid) tartottam fenn 4°C -on.

4.1.2. A rozsdamentes acél

A vizsgálatok során AISI 304-es típusú, 2B simaságú rozsdamentes acél lapocskákat, ún. kuponokat használtam fel ($1,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$; Ohw Heap Shang Hang Ltd., Bangkok, Thaiföld). A kuponokat semleges detergensben (Savona D2, Premiere Products, Cheltenham, Anglia) lemostam, desztillált vízzel leöblítettem, majd 30 perces ultrahangos rázással tovább tisztítottam (Sonicleaner, Ultrasonic Ltd., London, Anglia). Ezt követően a kuponokat megszáritottam és 3 órán át sterilizáltam 160°C -on (Gallenkamp Oven 300 Plus Series, Loughborough, Anglia).

4.1.3. Baktériumtapadás vizsgálata függőleges helyzetű kuponon

4.1.3.1. Törzsszuszpénzió készítése

A glicerinen fenntartott *Lactobacillus* tenyészetekből $100 \mu\text{l}$ -t oltottam be 150 ml MRS táplevesbe, és 30°C -on inkubáltam 18-24 órán keresztül 150 rpm -en történő rázatás mellett (Gallenkamp Orbital Incubator, Loughborough, Anglia) anaerob körülmények között

(CampyGen™ Atmosphere Generation System, Oxoid). A *Pseudomonas fluorescens* és *Listeria monocytogenes* törzseket 150 ml BHI tápveszbe oltottam be és 30°C-on inkubáltam 18-24 órán keresztül 150 rpm-en történő rázatás mellett. A felszaporított mikrobákat 10 percig centrifugáltam (Beckman® J2-21 modell) 15,000 (*Lactobacillus* törzs) illetve 5,500 (*Pseudomonas* és *Listeria* törzsek) g-értékkel. A felülúszót leöntöttem, a sejteket foszfát pufferrel (PBS, Oxoid) mostam, majd újra centrifugáltam a fenti paraméterek szerint. A felülúszót ismét leöntöttem és a sejteket PBS-ben reszuszpendáltam. A *Pseudomonas* és *Listeria* sejtek koncentrációját optikai denzitás alapján állítottam be OD₆₀₀=0.5-re (CECIL CE 21, 2000 series, Cecil Instruments Ltd., Cambridge, Anglia), ez 4-5x10⁸ telepkező egység (TKE)/ml (*Pseudomonas*), illetve 8-9x10⁸ TKE/ml (*Listeria*) csíraszámot jelent. A *Lactobacillus* sejteket 15 ml PBS-ben vettem fel, majd ebből egy decimális hígítást készítettem. A törzssuszpenzió csíraszama így 4-5x10⁸ TKE/ml-re állt be, amit MRS agaron (Oxoid) történő lemezöntéses csíraszám meghatározással állapítottam meg.

4.1.3.2. Tapadásvizsgálat

Az elkészített törzssuszpenziókból 1-1 ml-eket mértem be steril, 30 ml össztérfogatú, csavaros tetejű műanyag edényekbe (universal tube, Scientific Laboratories Supply, Nottingham, Anglia), majd PBS-sel 10 ml-re egészítettem ki őket a 2. táblázatban feltüntetett beállítások szerint.

2. táblázat: Kísérleti beállítások függőleges helyzetű kupon esetében

| Kombináció elnevezése | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (ml) | <i>P. fluorescens</i> (ml) | <i>L. monocytogenes</i> (ml) | PBS (ml) | Végső sejt-koncentráció (TKE/ml) |
|-----------------------|--|----------------------------|------------------------------|----------|--|
| Lb. | 1 | - | - | 9 | 4-5x10 ⁷ |
| Ps. | - | 1 | - | 9 | 4-5x10 ⁷ |
| Lm. | - | - | 1 | 9 | 8-9x10 ⁷ |
| Lb. + Ps. | 1 | 1 | - | 8 | 4-5x10 ⁷ 4-5x10 ⁷ |
| Lb. + Lm. | 1 | - | 1 | 8 | 4-5x10 ⁷ 8-9x10 ⁷ |

A steril kuponokat függőleges pozícióban helyeztem el az edényekben, ezzel biztosítva, hogy a kupon mindkét oldala elérhető legyen a baktériumok számára. A műanyag edények kúpos aljúak, így a kuponokat függőleges helyzetben tartják. A kuponokat 24 órán keresztül inkubáltam a sejtssuszpenzióban 30°C-on 100 rpm-en történő rázatás mellett. Az inkubációs idő letelte után a kuponokat steril csipesszel eltávolítottam, majd a nem tapadó baktériumokat

2x10 ml PBS-sel óvatosan leöblítettem. A kuponok szélét steril papírvattához érintve leitattam a nagyobb folyadékcseppeket, majd a kuponokat Bunsen-égő alatt megszáritottam.

4.1.3.3. A tapadó baktériumok számának meghatározása lemezöntéssel

A leöblített kuponokat egyenként 5 ml 2% Tween 80-nal kiegészített hígítófolyadékba helyeztem (MRD, Oxoid), és 2 percen át folyamatosan vortexeltem (Whirlimixer, Fisons Ltd., Loughborough, Anglia) a tapadó baktériumok eltávolítása céljából. A lerázott sejteket tartalmazó szuszpenzióból decimális hígítási sort készítettem, majd a csíraszámot szelektív tápagarak segítségével meghatároztam. A *Lactobacillus* törzsek esetében MRS agarral kétrétegű lemezöntést végeztem, a lemezeket 37°C-on inkubáltam, a telepszámlálást 2 nap elteltével végeztem el. A *Pseudomonas fluorescens* csíraszámot Pseudomonas szelektív agarra (Oxoid), a *Listeria monocytogenes* csíraszámot Listeria szelektív (Oxford) agarra (Oxoid) történő szélesztéssel határoztam meg. A telepszámot 30°C-on történő, egy napos inkubálás után határoztam meg.

4.1.3.4. Mikroszkópos vizsgálat

A kupon festése

A megszáritott kuponokat fluoreszcens festékekkel festettem. A *Lactobacillus* és *Pseudomonas* törzsek kölcsönhatásának vizsgálatokor a LIVE BacLight™ Bacterial Gram Stain Kit-et (L-7005, Molecular Probes, Leiden, Hollandia) használtam. A Kit két fluoreszcens festékkomponenst tartalmaz: a zöld fluoreszcens SYTO 9-et és a vörös fluoreszcens hexidium-jodidot, mindkettő nukleinsav kötő festék. Összekevertem 3 µl SYTO 9 és 0,5 µl hexidium-jodid törzsoldatot (3,34 mM SYTO 9 és 4,67 mM hexidium-jodid 300-300 µl DMSO-ban oldva) és steril desztillált vízzel 1 ml-re hígítottam. Minden kuponra 250-300 µl-t pipettáztam a festékelegyből, majd a pipetta hegyével óvatosan eloszlattam, hogy teljesen beborítsa a kupon felületét. A kuponokat 15 percig sötétben inkubáltam, majd a felesleges festéket 2x10 ml PBS-sel óvatosan leöblítettem. A *Lactobacillus* és *Listeria* törzsek kölcsönhatásának vizsgálatokor 0,01%-os akridin narancssal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) festettem meg a baktériumokat. (Ebben az esetben nincs értelme a fenti Kit-et használni, hiszen mind a két baktérium Gram-pozitív.) A festést az előzőekben leírt módon végeztem azzal a különbséggel, hogy 2-3 percig festettem a kupont és nem alkalmaztam sötétben történő inkubálást. A felesleges festéket itt is 2x10 ml PBS-sel öblítettem le. A kuponok szélét steril papírvattához érintve leitattam a nagyobb folyadékcseppeket, majd a kuponokat Bunsen-égő alatt megszáritottam.

A kupon mikroszkópos vizsgálata

A LIVE BacLight™ Bacterial Gram Stain Kit élő baktériumok Gram csoport szerinti elkülönítését teszi lehetővé. A Kit-ben lévő két fluoreszcens festék eltérő spektrális tulajdonságokkal rendelkeznek, illetve eltérően festi a Gram-pozitív illetve Gram-negatív baktériumokat: a SYTO 9 mindkét baktériumtípust jelöli, a hexidium-jodid csak a Gram-pozitívokat. A Gram-pozitív baktériumokban a hexidium jodid hatékonyan elfedi a SYTO 9-et. A gerjesztő/emittált fény hullámhossza a SYTO 9 esetében 480/500 nm, a hexidium-jodid esetében 480/625 nm. Gram-pozitív és -negatív baktériumokat is tartalmazó festett tenyészetben tehát a Gram-negatív baktériumok zölden, a Gram-pozitívok pedig pirosan fluoreszkálnak. (Az elpusztult baktériumok különféleképpen festődnek.) Megfelelő színszűrők közbeiktatásával elkülöníthetőek a Gram-pozitív baktériumok, hiszen csak ezek tartalmazzák a hexidium-jodidot.

A festett kuponokat pillanatragasztóval tárgylemezekhez rögzítettem. Az acélfelületre tapadó baktériumokat fluoreszcens mikroszkóp alatt (Axiovert 135TV, Carl Zeiss, Jena, Németország) vizsgáltam meg 40x és 100x olaj immerziós objektíveket használva. Kupononként 10-10 véletlenszerűen kiválasztott látómezőt fényképeztem le (ORCA-2 hűtött CCD kamera, Hamamatsu) 100x olaj immerziós objektívet használva az Openlab 2.2.5. program (Improvision Ltd.) segítségével. A mikroszkóp beállításait a 3. és 4. táblázatok mutatják.

3. táblázat: A mikroszkóp beállításai *Lactobacillus* (Lb.) és *Pseudomonas* (Ps.) törzsek vizsgálatakor

| | Megvilágító fény hullámhossza | Szűrő | A mikroszkópban látható baktérium(ok) |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Lb. | 479 nm | GFP/FITC 535RDF45 488,0 nm | <i>Lb. delbrueckii</i> |
| Ps. | 479 nm | GFP/FITC 535RDF45 488,0 nm | <i>P. fluorescens</i> |
| Lb. + Ps. | 553 nm | CY3/TRI 95RDF60 550,0 nm | <i>Lb. delbrueckii</i> |
| | 479 nm | GFP/FITC 535RDF45 488,0 nm | <i>Lb. delbrueckii</i> és <i>P. fluorescens</i> |

4. táblázat: A mikroszkóp beállításai *Lactobacillus* (Lb.) és *Listeria* (Lm.) törzsek vizsgálatakor

| | Megvilágító fény hullámhossza | Szűrő | A mikroszkópban látható baktérium(ok) |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Lb. | 423 nm | GFP/FITC 535RDF45 488,0 nm | <i>Lb. delbrueckii</i> |
| Lm. | 423 nm | GFP/FITC 535RDF45 488,0 nm | <i>L. monocytogenes</i> |
| Lb. + Ps. | 423 nm | GFP/FITC 535RDF45 488,0 nm | <i>Lb. delbrueckii</i> és <i>L. monocytogenes</i> |

A borítottság százalékanak meghatározása (képanalízis)

Az elmentett képeken meghatároztam a baktériumok által borított terület nagyságát pixelben (Scion Image Software, Scion Corporation, Frederick, MD, USA). A kapott értéket elosztva a teljes kép - szintén pixelben megadott - méretével, megkaptam a borítottságot, majd ezt 100-zal megszorozva a borítottság százalékát. A *P. fluorescens* általi borítottságot úgy határoztam meg, hogy a két baktérium által borított terület nagyságából kivontam a *Lactobacillus* sejtek által borított terület nagyságát. Mivel a *Lactobacillus* és *Listeria* sejteket nem lehetett egymástól festés alapján elkülöníteni a kevert tenyészetben, ezért a képanalízist itt vizuális elkülönítéssel egészítettem ki.

A tapadásvizsgálatot négy (Lb.+Ps.) illetve három (Lb.+Lm.) ismétlésben végeztem el, minden kísérletben 3-3 kupont használtam az adott beállítások tesztelésére – ebből a két kupont a lemezöntéses csíraszám-bebecsléshez használtam, egyet mikroszkópos vizsgálatnak vettem alá.

4.1.4. Baktériumtapadás vizsgálata vízszintes helyzetű kuponon

4.1.4.1. Törzssuszpenzió készítése

A törzssuszpenziókat a 4.1.3.1. pontban leírtaknak megfelelően készítettem el azzal a különbséggel, hogy a csíraszámot valamennyi baktériumtörzs esetében 10^8 TKE/ml-re állítottam be optikai denzitás alapján. Ehhez előzetesen meghatároztam az ehhez a sejtkoncentrációhoz tartozó OD₆₀₀ értéket minden egyes törzs esetében.

4.1.4.2. Tapadásvizsgálat [CHAE et SCHRAFT 2001] nyomán

Tapadásvizsgálat foszfát pufferben

A steril kuponokat vízszintes pozícióban helyeztem el telített páratartalmú kamrákban. A kamrákat a következő módon készítettem: műanyag petricsészék aljára megfelelő nagyságú,

kör alakú szűrőpapírt helyeztem, melyet előzőleg PBS-sel itattam át, a petricsészékre ráhelyeztem a tetejüket, végül parafilmmel lezártam őket. A telített páratartalmú kamrában történő inkubálás megakadályozza a baktériumszuszpenzió párolgását, ezáltal a sejtkoncentráció megváltozását. A törzsszuszpenziókból a következő beállításokat készítettem: *Lb. delbueckii* subsp. *bulgaricus*, *P. fluorescens* és *L. monocytogenes* egyedi kultúrában valamint *Lb. delbueckii* subsp. *bulgaricus* kevert kultúrában *P. fluorescens*-szel illetve *L. monocytogenes*-szel. A baktériumok végső koncentrációját PBS-sel állítottam be, ez minden törzsre nézve 10^7 TKE/ml volt. 150-150 µl-eket pipettáztam a kuponokra úgy, hogy a baktériumszuszpenziók teljesen beborítsák a felületüket. A kamrákat 30°C-on inkubáltam 3 órán keresztül. Az inkubációs idő letelte után a kuponokat steril csipesszel eltávolítottam, majd a nem tapadó baktériumokat 2x10 ml PBS-sel óvatosan leöblítettem. A kuponok szélét steril papírvattához érintve leittattam a nagyobb folyadékcseppeket, majd a kuponokat Bunsen-égő alatt megszáritottam.

4.1.4.3. Mikroszkópos vizsgálat

A kupon festése

A megszáritott kuponokat a 4.1.3.4. pontban leírtaknak megfelelően 250-300 µl 0,01%-os akridin narancssal festettem. A felesleges festéket 2x10 ml PBS-sel leöblítettem, a kuponok szélét steril papírvattához érintve leittattam a nagyobb folyadékcseppeket, majd a kuponokat Bunsen-égő alatt megszáritottam.

A kupon mikroszkópos vizsgálata és a tapadó baktériumok számának meghatározása

A festett kuponokat a 4.1.3.4. pontban leírtaknak megfelelően tárgylemezekhez rögzítettem, fluoreszcens mikroszkóp alatt megvizsgáltam és 100x olajimmerziós objektívet használva, kupononként 10-10 véletlenszerűen kiválasztott látómezőt lefényképeztem. A tapadó baktériumok számát – morfológiai alapon történő azonosítás után - vizuális sejtszámlálással határoztam meg. Vonatkoztatási alapként a lefotózott látótér mm^2 -ben megadott mérete szolgált ($5,73 \times 10^{-3} \text{mm}^2$).

A tapadásvizsgálatot két ismétlésben végeztem el, minden kísérletben 2-2 kupont használtam az adott törzs/ek tesztelésére.

4.2. Baktériumtapadás vizsgálata bélhámsejteken

4.2.1. Mikroorganizmusok

A vizsgálatokban a következő baktérium törzseket használtam fel: *Lactobacillus plantarum* 2142, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2750, *Lb. casei* subsp. *casei* 2752, *Lb. casei* subsp. *casei* 2756, *Lb. casei* subsp. *casei* 2763, *Lb. curvatus* 2768, *Lb. curvatus* 2770, *Lb. curvatus* 2771, *Lb. curvatus* 2775, *Lb. sakei* DSM20017, *Bifidobacterium bifidum* B3.2, *Escherichia coli* Bay 100. A *Lactobacillus* törzsek a Perugia-i Egyetem törzsgyűjteményéből származnak (Dairy Institute Collection of the Agricultural Faculty of Perugia, Perugia, Olaszország). Korábbi vizsgálatokban már bebizonyosodott, hogy az előbbi törzsek közül néhány jó tapadóképeséget mutat Caco-2 és IEC-18 bélhámsejtekhez, azonban ezek az előzetes vizsgálatok más kísérleti körülmények között történtek, valamint a tapadó baktériumok kimutatása csak mikroszkópos vizsgálattal történt (SZEKÉR et al., 2005). A törzseket tej táplevesben tartottam fenn 4°C-on. A *Bifidobacterium* törzset a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékétől kaptam. A törzset csecsemő székletből izolálták, majd fermentációs tesztek valamint 16S rDNS szekvencia analízis alapján azonosították [MAYER et al. 2003]. A törzs fenntartása 87%-os glicerinben (Reanal, Budapest) történt -20°C-on. Az *E. coli* Bay100 törzset a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kara Gyógyszertani és Méregtani Tanszékétől kaptam. A törzset elválasztott malac bélsarából izolálták, majd biokémiai tesztekkel azonosították. Szerológiai vizsgálat alapján az O139:K82 szerotípusba sorolták. Az *E. coli* törzset félferde BHI agaron (Merck, Darmstadt, Németország) tartottam fenn 4°C-on.

4.2.2. Caco-2 sejtkultúra

A tapadás vizsgálatokban használt emberi vastagbél adenokarcinoma sejtvonal (Caco-2, ATCC HTB 37) Dr. Jos Koninkx (Utrecht University, Hollandia) ajándéka volt. A sejtek tenyésztése és fenntartása 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett történt Dulbecco's Modified Eagle's tápfolyadékban (DMEM, Sigma-Aldrich), amelyhez előzőleg 1% (v/v) MEM-nem esszenciális aminosav oldatot, 50 mg/l gentamicin-szulfátot, 100 mg/l kanamicin-szulfátot, 4 mM glutamint, 25 mM Hepes puffert, 1 mM nátrium-piruvátot (valamennyi vegyszer Sigma-Aldrich) és 10% (v/v) hő-inaktivált fetális bovin szérumot (FBS, Gibco, Paisley, Anglia) adtam hozzá. A tápfolyadékot heti három alkalommal cseréltem. A Caco-2 sejteket 40,000 sejt/cm² koncentrációban vittem át 24 lyukú sejttenyésztő edényekbe (2 cm²/lyuk, Costar, Corning, NY, USA). A lyukakba előzőleg 70%-os alkoholban zsírtalanított

és UV fényel 3-4 órán át sterilizált fedőlemezeket (Gerhard Menzel, Braunschweig, Németország) helyeztem. A Caco-2 sejteket 14 napig tenyésztettem a vizsgálatokhoz.

4.2.3. Baktérium törzsszuspenziók készítése

A tejtáptalajban fenntartott *Lactobacillus* tenyészetekből 200 µl-t oltottam be 10 ml MRS táplevesbe (Merck) és 30°C-on inkubáltam 24 órán keresztül statikusan. A friss tenyészetekből tovább oltottam MRS táplevesbe és ismét a fenti paraméterek szerint inkubáltam a tenyészeteket. A *Bifidobacterium* törzs glicerinben fenntartott tenyészetét 10 ml Trypticase-Phytone-Yeast (TPY) táplevesbe (M.2. melléklet) vittem át, majd 37°C-on inkubáltam 24 órán keresztül statikusan anaerob körülmények között (Bugbox, Ruskin Technology, Leeds, Anglia). Az átoltást legalább háromszor ismételtem mielőtt a törzset a kísérletekben felhasználtam. Az *E. coli* törzs félferde agaron fenntartott tenyészetéből egy kacsnyit oltottam be 10 ml steril BHI táplevesbe (Merck) és 37°C-on inkubáltam 18 órán keresztül. A felszaporított mikrobák tenyészetéből 1-1 ml-t steril Eppendorf csövekbe mértem, majd 5 percig centrifugáltam (Minispin, Eppendorf, Hamburg, Németország) 13,000g sebességgel 4°C-on. A felülúszót leöntöttem, a sejteket steril fiziológiás sóoldattal mostam, majd újra centrifugáltam a fenti paraméterek szerint. A felülúszót ismét leöntöttem és a sejteket fiziológiás sóoldatban vagy antibiotikum- és FBS-mentes DMEM-ben (a továbbiakban: sima DMEM) reszuszpendáltam.

4.2.4. Tapadásvizsgálat különböző detektálási módszerekkel

Ebben a kísérletben három baktériumtörzset használtam fel: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2750, *Lb. sakei* és *Bifidobacterium bifidum* B3.2. A kísérletet két ismétlésben végeztem el.

4.2.4.1. Tapadásvizsgálat

Tízszeres hígítást készítettem a hexidium-jodid törzsoldatból (LIVE BacLight™ Bacterial Gram Stain Kit; L-7005, Molecular Probes) steril desztillált vízzel, majd ebből 7,5 µl-t adtam hozzá 1-1 ml - fiziológiás sóoldatban felvett – törzsszuspenzióhoz, majd 30 percen keresztül sötétben inkubáltam 50 rpm-en történő rázatás mellett (LE-204/2, Laboratóriumi Műszergyár Rt., Budapest). Festés után a baktérium szuszpenziókat négyszer mostam steril fiziológiás sóoldattal, hogy eltávolítsam a felesleges festéket. Hasonló módon négyszer mostam 1-1 ml festetlen baktérium törzsszuspenziót is, ezáltal kiküszöböltem a centrifugálásokból adódó

csíraszám-veszteség miatti különbségeket. Mosás után a baktériumokat sima DMEM-ben reszuszpendáltam. A Caco-2 sejteket 1-1 ml sima DMEM-mel mostam, majd - a megfelelő hígítás után - kb. 10^7 TKE/lyuk baktérium szuszpenziót (fluoreszcensen festett illetve festetlen) helyeztem a lyukakba (két illetve négy) párhuzamosban. A törzsszuszpenziók koncentrációját lemezöntéses csíraszám-meghatározással pontosítottam. A *Lactobacillus* törzsek esetében MRS agart (Merck), a *Bifidobacterium* törzs esetében TPY agart (M.2. melléklet) használtam. Egy óra inkubálás után 37°C-on 5% CO₂-ot tartalmazó párásított légtérben, a Caco-2 sejteket kétszer mostam 1-1 ml sima DMEM-mel, hogy eltávolítsam a nem tapadó baktériumokat.

4.2.4.2. A tapadó baktériumok számának meghatározása lemezöntéssel

A lemezöntéses csíraszám meghatározásra szánt lyukakba 0,5 ml tripszin oldatot (M.2. melléklet) pipettáztam, majd 15 percen keresztül inkubáltam 37°C-on. A tripszin reakció után 0,5 ml 10% FBS-sel kiegészített sima DMEM-et adtam a sejtekhez. Az epithel sejteket – a hozzájuk tapadó baktériumokkal együtt – ismételt pipettázásokkal távolítottam el az üveglapokról, majd fiziológias sóoldatban sorozathígítást készítettem belőlük. A megfelelő hígítási tagok csíraszámát lemezöntéssel határoztam meg. A *Lactobacillus* törzsek esetében MRS agart használtam, telepszámlálás előtt a lemezeket aerob körülmények között inkubáltam 30°C-on 48 órán át. A *Bifidobacterium* törzs esetében TPY agart használtam, a telepek számát 72 óra elteltével határoztam meg a lemezek 37°C-on, anaerob körülmények között történő inkubálása után.

4.2.4.3. Mikroszkópos vizsgálat

A mikroszkópos vizsgálatra szánt lyukakba 1 ml 10%-os formaldehid oldatot (Reanal) pipettáztam a készítmény rögzítése érdekében. Tíz perc fixálás után a még festetlen készítményeket Gram szerint megfestettem (GRAM-color Staining Set, Merck), majd valamennyi lyukból eltávolítottam az üveglapokat és mowiol oldattal (M.2. melléklet) tárgylemezekre ragasztottam őket. A tapadó baktériumokat 1000x-es nagyítással vizsgáltam (Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Németország). A fluoreszcensen festett baktériumok vizualizálását UV megvilágítás mellett, az XF43 szűrő (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA) közbeiktatásával végeztem. Minden üveglap esetén 10-10 látótérrel ($8,6 \times 10^{-3}$ mm²) fényképet készítettem (AxioCam HRC, Carl Zeiss) és mentettem el az AxioVision 4.5 program (Carl Zeiss) segítségével. A baktériumtapadás mértékét sejszámlálással állapítottam meg. Emellett meghatároztam a baktériumok által borított terület százalékos arányát is a Scion Image képelemző program segítségével (4.1.3.4. pont).

4.2.5. *Lactobacillus* törzsek tapadásának tesztelése

Ebben a kísérletben a 4.2.1. pontban felsorolt *Lactobacillus* törzseket használtam a *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2750 és a *Lb. sakei* DSM20017 kivételével. A kísérletet két ismétlésben végeztem el.

4.2.5.1. Tapadásvizsgálat

A Caco-2 sejteket 1-1 ml sima DMEM-mel mostam, majd a baktériumok sima DMEM-ben felvett törzssuszpenzióiból (4.2.3. pont) - a megfelelő hígítás után - kb. 10^7 TKE/lyuk baktérium szuszpenziót helyeztem a lyukakba minden törzs esetén 2-2 párhuzamosban. A törzssuszpenziók koncentrációját lemezöntéses csíraszám-meghatározással pontosítottam MRS agaron. Egy óra inkubálás után 37°C-on 5% CO₂-ot tartalmazó párásított légtérben, a Caco-2 sejteket kétszer mostam 1-1 ml sima DMEM-mel, hogy eltávolítsam a nem tapadó baktériumokat.

4.2.5.2. Mikroszkópos vizsgálat

Mosás után 1-1 ml 10%-os formaldehid oldattal fixáltam a sejteket 10 percen keresztül. A készítményt ezután Gram szerint megfestettem, majd valamennyi lyukból eltávolítottam az üveglapokat és mowiol oldattal tárgylemezre ragasztottam őket. A tapadó baktériumokat a 4.2.4.3. pontban leírtak alapján mikroszkópos vizsgálatnak vettem alá.

4.2.6. A *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 tapadásának vizsgálata a kiindulási koncentráció függvényében

A kísérletet két ismétlésben végeztem el.

4.2.6.1. Tapadásvizsgálat

A *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 törzs sima DMEM-ben felvett törzssuszpenzióiból (4.2.3. pont) decimális hígítást készítettem. A Caco-2 sejteket 1-1 ml sima DMEM-mel mostam, majd a hígításokból kb. 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 TKE/lyuk baktérium szuszpenziót pipettáztam a lyukakba 4 párhuzamosban. A törzssuszpenziók koncentrációját lemezöntéses csíraszám-meghatározással pontosítottam MRS agaron. Egy óra inkubálás után 37°C-on 5% CO₂-ot tartalmazó párásított légtérben, a Caco-2 sejteket kétszer mostam 1-1 ml sima DMEM-mel, hogy eltávolítsam a nem tapadó baktériumokat.

4.2.6.2. A tapadó baktériumok számának meghatározása

Valamennyi hígítási tag esetében 3-3 lyukban lemezöntéses csíraszám becsléssel határoztam meg a tapadó baktériumok számát MRS agaron. A negyedik lyukokban a sejteket Gram szerint festettem, majd a tapadó baktériumokat a 4.2.4.3. pontban leírtak alapján mikroszkópos vizsgálatnak vettem alá.

4.2.7. A *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* 2749 és az *Escherichia coli* Bay 100 törzsek versengő tapadásának vizsgálata

A kísérletet három ismétlésben végeztem el, azonban az egyik kísérletben csak lemezöntéses csíraszám becsléssel határoztam meg a tapadó baktériumok számát.

4.2.7.1. Tapadásvizsgálat

A Caco-2 sejteket 1-1 ml sima DMEM-mel mostam, majd a baktériumok sima DMEM-ben felvett törzsszuspenzióiból (4.2.3. pont) kb. 10^7 illetve 10^8 TKE/lyuk baktérium szuszpenziót pipettáztam a lyukakba egyedi és kevert tenyészetben, 2-2 párhuzamosban a következő beállítások szerint:

5. táblázat: Kísérleti beállítások versengő tapadás esetén Caco-2 sejteken

| Lyukak | Lb. | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | Lb. + <i>E. coli</i> | | Lb. + <i>E. coli</i> | |
|------------------------------------|--------|----------------|----------------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| Végső sejt-koncentráció (TKE/lyuk) | 10^8 | 10^7 | 10^8 | 10^8 | 10^7 | 10^8 | 10^8 |

A törzsszuspenziók koncentrációját lemezöntéses csíraszám-meghatározással pontosítottam. A *Lactobacillus* törzsek esetében MRS agart, az *E. coli* törzs esetében ChromoBio Coliform agart (Biolab, Budapest) használtam. Egy óra inkubálás után 37°C-on 5% CO₂-ot tartalmazó párasított légtérben, a Caco-2 sejteket kétszer mostam 1-1 ml sima DMEM-mel, hogy eltávolítsam a nem tapadó baktériumokat.

4.2.7.2. A tapadó baktériumok számának meghatározása

Valamennyi beállítás esetében két lyukban lemezöntéses csíraszám becsléssel határoztam meg a tapadó baktériumok számát (4.2.4.2. pont). Az *E. coli* törzs esetében ChromoBio Coliform agart használtam, a telepek számát 24 óra elteltével határoztam meg a lemezek 37°C-on, aerob körülmények között történő inkubálása után. (A kromogén táptalajon az *E. coli* kékeslila telepeket képez.)

Két-két lyukban a sejteket Gram szerint festettem, majd a tapadó baktériumokat a 4.2.4.3. pontban leírtak alapján mikroszkópos vizsgálatnak vettem alá azzal az eltéréssel, hogy a fotókat Dp50 digitális fényképezőgéppel (Olympus, Tokyo, Japán) készítettem a Viewfinder lite program (Olympus) segítségével. A látótér mérete $1,4 \times 10^{-2}$ mm² volt.

4.3. Versengő szaporodás vizsgálata folyékony tápközegekben

4.3.1. Mikroorganizmusok

A vizsgálatokban a következő baktérium törzseket használtam fel: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM1881, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 (4.2.1. pont), *Bacillus cereus* T és *Escherichia coli* Bay100 (4.2.1. pont). *Lactococcus* törzs a cseh törzsgyűjteményből (Czech Collection of Microorganisms, CCM, Brno, Csehország) származó, nizin termelő törzs, amelyet *Clostridium* eredetű gáztermelés megakadályozására használnak svájci sajtokban. A tejsavbaktérium törzseket tej táplevesben (M.2. melléklet) tartottam fenn 4°C-on. A *B. cereus* T egy pszichrofil *Bacillus* törzs. Az *E. coli* és a *B. cereus* törzseket félférde BHI agaron tartottam fenn 4°C-on.

4.3.2. Bacillus cereus T törzs nizin érzékenységének vizsgálata

24 órás tenyészeteket készítettem a *B. cereus* T törzsből BHI táplevesben 30°C-on rázatva (SW22, Julabo, Seelbach, Németország), majd 0,2 ml friss sejtszuszpenziót 10 ml BHI lágyagarhoz mértem hozzá. Vortexelés (Reax control, Heidolph, Schwabach, Németország) után a lágyagart petricsészébe öntöttem, és hagytam megszilárdulni. A petricsészében a *B. cereus* csíraszama kb. 10^7 TKE/ml lett. A megszilárdult agarba 6 mm átmérőjű lyukakat fűrtam, majd ezekbe 25 µl-t pipettáztam a nizin törzsoldatból (2 mg/ml, M.2. melléklet), valamint a törzsoldat két-, négy-, és nyolcszoros hígításaiból két párhuzamosban. A lemezeket ezután 30°C-on inkubáltam (KB 240, Binder, Tuttlingen, Németország) 1 napig, majd a feltisztulási zónák átmérőjét vonalzó segítségével lemértem.

4.3.3. Lactococcus lactis subsp. lactis 1881 és Bacillus cereus T versengő szaporodása PCB-ben

18 órás tenyészeteket készítettem a két baktérium törzsből: a *B. cereus*-t BHI táplevesben rázatva, a *Lc. lactis*-t MRS táplevesben statikusan szaporítottam el 30°C-on. *B. cereus* spórákat 60°C-on 30 percig hőaktiváltam. 500 ml-es steril, csavaros tetejű centrifuga

csövekbe bemértem 300 ml steril PCB táplevest (M.2. melléklet), majd két párhuzamosan beoltottam az edényeket a következő beállítások szerint:

6. táblázat: Kísérleti beállítások *Lc. lactis* subsp. *lactis* és *B. cereus* T versengő szaporodása esetén PCB-ben.

| Kombináció elnevezése | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>B. cereus</i> vegetatív sejt | <i>B. cereus</i> spóra | Kiindulási sejt-koncentráció (TKE/ml) |
|-----------------------|--|---------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| 1-2 | + | - | - | 10^6 |
| 3-4 | | + | - | 10^3 |
| 5-6 | - | - | + | 10^3 |
| 7-8 | + | + | - | 10^6 10^3 |
| 9-10 | + | - | + | 10^6 10^3 |

Az edényekben kiindulási sejtkoncentrációt Thoma kamrában történő mikroszkópos sejtszámlálás alapján állítottam be, majd a pontos értékeket MRS agaron (*Lactococcus*) illetve véres agaron (*Bacillus*, M.2. melléklet) történő lemezöntéses csíraszám meghatározással állapítottam meg. A beoltott edényeket 30°C-on inkubáltam statikusan, majd meghatározott időközönként (0, 4, 8, 24, 48, 72 óra) mintát vettem belőlük. A mintákból peptonvízben (M.2. melléklet) decimális hígítási sort készítettem, majd MRS táptalajon határoztam meg a tejsavbaktérium számot, véres agaron a *Bacillus cereus* számot. A *Lactococcus* esetében MRS agarral kétrétegű lemezöntést végeztem, a lemezeket 30°C-on inkubáltam, a telepszámlálást 2 nap elteltével végeztem el. A *Bacillus cereus* csíraszámot véres agarra történő szélesztéssel határoztam meg. A csíraszámom belül külön meghatároztam a spórák számát úgy, hogy a szélesztést megelőzően egy 60°C-on 30 percig történő hőkezelést végeztem a vegetatív sejtek elpusztítása céljából. A telepszámot 30°C-on történő, két napos inkubálás után határoztam meg. A vett mintákban meghatároztam a pH-t Physitemp típusú pH mérővel (Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, USA), amelyhez OP-0808P kombinált üvegelektrod (Radelkis, Budapest) kapcsolódott.

4.3.4. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1881 és *Bacillus cereus* T versengő szaporodása tejben

A kísérletet a 4.3.2. pontban leírtak szerint végeztem, azzal a különbséggel, hogy PCB tápleves helyett 0,1% zsírtartalmú UHT tejbe (Parmalat, Budapest) oltottam be a

baktériumokat. Ebben a vizsgálatban *B. cereus* esetén csak a teljes sejtszámot határoztam meg kioltáskor.

4.3.5. *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* 2749 és *Escherichia coli* Bay100 versengő szaporodása csicsókalében

18 órás tenyészeteket készítettem a két baktérium törzsből: az *E. coli*-t BHI táplevesben rázatva 37°C-on, a *Lc. lactis*-t MRS táplevesben statikusan 30°C-on szaporítottam el. 150 ml-es Erlenmeyer lombikokba bemeétem 100 ml 7,5%-os csicsókalevet (M.2. melléklet), majd beoltottam az edényeket. Az edényekben a kiindulási sejtkoncentrációt Thoma kamrában történő mikroszkópos sejtszámlálás alapján állítottam be, majd a pontos értékeket MRS agaron (*Lactobacillus*) illetve ChromoBio Coliform agaron (*E. coli*) történő lemezöntéses csíraszám meghatározással állapítottam meg. A beoltott edényeket 25°C-on inkubáltam statikusan 0-48 óráig, majd hűtőhőmérsékleten (12°C) tároltam tovább őket. Az edényekből meghatározott időközönként (0, 4, 8, 24, 48, 168 óra) mintát vettem. A mintákból peptonvízben decimális hígítási sort készítettem, majd MRS táptalajon határoztam meg a tejsavbaktérium számot, ChromoBio Coliform agaron az *E. coli* számot. Az MRS agar lemezeket 30°C-on inkubáltam, a telepszámlálást 2 nap elteltével végeztem el. Az *E. coli* telepszámot 37°C-on történő, 24 órás inkubálás után határoztam meg. A vett mintákban meghatároztam a pH-t.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Baktériumtapadás vizsgálata rozsdamentes acélon

5.1.1. Baktériumtapadás vizsgálata függőleges helyzetű kuponon - *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* és *P. fluorescens kölcsönhatása*

5.1.1.1. A tapadó baktériumok élő csíraszámának meghatározása lemezöntéssel

A *Lactobacillus* négy kísérletből háromban - mind az egyedi, mind a *P. fluorescens*-szel kevert tenyészetben - 10^5 TKE/cm² nagyságrendben tapadt a rozsdamentes acélhoz (összfelület 4,5 cm²) (6. táblázat). Ez azt jelenti, a kezdeti sejtkoncentráció ($4-5 \times 10^7$ TKE/ml) figyelembe véve, hogy a szuszpenzióban lévő baktériumok kb. 0,1%-a tapadt az acélfelülethez. A negyedik ismétlésben az élőcsíraszám 10^3 TKE/cm²-re csökkent.

6. táblázat: A kuponokról lerázott *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Lb) és *P. fluorescens* (Ps) élő csíraszama egyedi és kevert tenyészetben. Kiindulási koncentrációk: $4-5 \times 10^7$ TKE/ml.

| A kísérlet sorszama | Lb egyedi tenyészetben (LogTKE/cm ²) | Ps egyedi tenyészetben (LogTKE/cm ²) | Lb kevert tenyészetben (LogTKE/cm ²) | Ps kevert tenyészetben (LogTKE/cm ²) |
|---------------------|--|--|--|--|
| 1. | 4,9 | 7,0 | 5,1 | 7,3 |
| 2. | 4,7 | 7,0 | 4,9 | 7,0 |
| 3. | 5,4 | 6,8 | 5,4 | 6,8 |
| 4. | 3,6 | 7,2 | 3,2 | 7,1 |
| Eredmények átlaga | 5,1 (1-3. kísérlet) | 7,0 | 5,2 (1-3. kísérlet) | 7,1 |

A *P. fluorescens* élő csíraszama minden ismétlésben elérte a 10^7 TKE/cm² nagyságrendet, azaz a sejtek kb. 10%-a tapadt a kuponhoz. A *Pseudomonas fluorescens* poláris flagellával rendelkezik, így aktív mozgással képes eljutni a különböző felületekhez. A flagellának különösen a tapadás kezdeti szakaszában van szerepe. Forgó mozgása később előidézheti a megtapadt baktériumsejt leválását a felületről. Az irodalom a *Pseudomonas* fajokat, mint elsődleges biofilm képző baktériumokat tartja számon, melyek további fajok megtelepedését

is elősegítik [SASAHARA & ZOTTOLA 1993]. A *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ezzel szemben nem rendelkezik flagellával, nem motilis, és nagy méretű sejtjei könnyen kiülednek a szuszpenzióból.

Számos baktérium esetében a közeg kis tápanyag tartalma fokozza a tapadás mértékét, mivel az elérhető tápanyagok a felszínhez adszorbeálódnak, amit a baktériumok a koncentráció gradiens mentén migrálva megtalálnak és hozzákötődnek. Fordítva: a nagy tápanyag tartalmú közegben a tapadás azért kisebb mértékű, mert a baktériumok sejt felszíni receptorai telítődnek a közegben jelenlévő tápanyagokkal és már nem képesek megkötni a felszínhez adszorbeálódó tápanyagokat [ZOTTOLA & SASAHARA 1994]. Kísérleteim során ezért PBS pufferben vizsgáltam a baktériumtapadást, ami nem tartalmaz szerves tápanyagokat, így szerves anyagok egyedül a baktérium szuszpenzióból, az elpusztuló, széteső sejtekből kerülhettek a közegbe, és adszorbeálódhattak a kupon felületéhez. Ezáltal olyan tápanyag szegény közeg jött létre, ami növelhette a baktériumtapadás mértékét.

A tejsavbaktérium esetében az eredmények nem bizonyultak reprodukálhatónak, ezért ezeket nem vontam be a statisztikai vizsgálatba. A *P. fluorescens* tapadásának statisztikai értékelésére Poisson-eloszlást alkalmaztam, mivel a lemosott, majd meghígított mintában a baktérium szám Poisson-eloszlást követ (7. táblázat). A próba elvégzése után megállapítottam, hogy kevert tenyészetben szignifikánsan több *Pseudomonas* sejt tapad a kuponhoz, mint egyedi tenyészetben ($p=0,0039$). Ugyanakkor tekintettel arra, hogy az eltérés mértéke csupán $1,84 \times 10^6$ TKE/ml volt, ráadásul ilyen mértékű ingadozások a telepszámban az egyes ismétlések között is megfigyelhetők voltak, a különbséget nem tekintettem relevánsnak.

7. táblázat: *P. fluorescens* egyedi (Ps) és kevert (Ps (+Lb)) tenyészetben mért tapadásának statisztikai vizsgálata. Kiindulási koncentráció: $4-5 \times 10^7$ TKE/ml, $n=4$

| Kísérleti beállítás | Átlag (TKE/ml) | Átlagok közti különbség | 95%-os konfidencia intervallum | | p érték |
|---------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------|---------|
| Ps | $1,00 \times 10^7$ | $1,84 \times 10^6$ | $6,0 \times 10^5$ | $3,08 \times 10^6$ | 0,0039 |
| Ps (+Lb) | $1,19 \times 10^7$ | | | | |

5.1.1.2. A tapadó baktériumok mikroszkópos vizsgálata

A *Lactobacillus* általi borítottság a négy kísérletben széles határok között változott: 3,16% – 11,3% egyedi tenyészetben és 0,30% - 12,12% kevert tenyészetben, emellett az egyes kísérletekben az átlagokhoz tartozó szórások is nagyok voltak (8. táblázat). A 3. és 4. kísérletben a borítottsági értékek 0,5% alá csökkentek (ennél a borítottságnál egy-egy

mikroszkópos látómezőn 0-3 baktérium látható), emellett a 4. kísérletben az élőcsíraszám is csak 10^3 TKE/ml nagyságrendű volt. A tejsavbaktériumok tapadásvizsgálata tehát ezzel a detektálási módszerrel sem adott reprodukálható eredményeket a függőleges helyzetű kuponon. A különbségek valószínűleg abból adódtak, hogy a sejtek egy része elpusztult vagy élő, de nem kitenyészthető (VBNC) állapotba került a 24 órás foszfát pufferben történő inkubálás során, valamint hogy a nagy méretű, nem motilis baktériumok hamar kiüledtek a szuszpenzióból és ezért nem volt lehetőségük a felülethez tapadni. Az alkalmazott, 100 rpm-en történő rázatás nem volt alkalmas a kiüledés megakadályozására, illetve a tapadás elősegítésére.

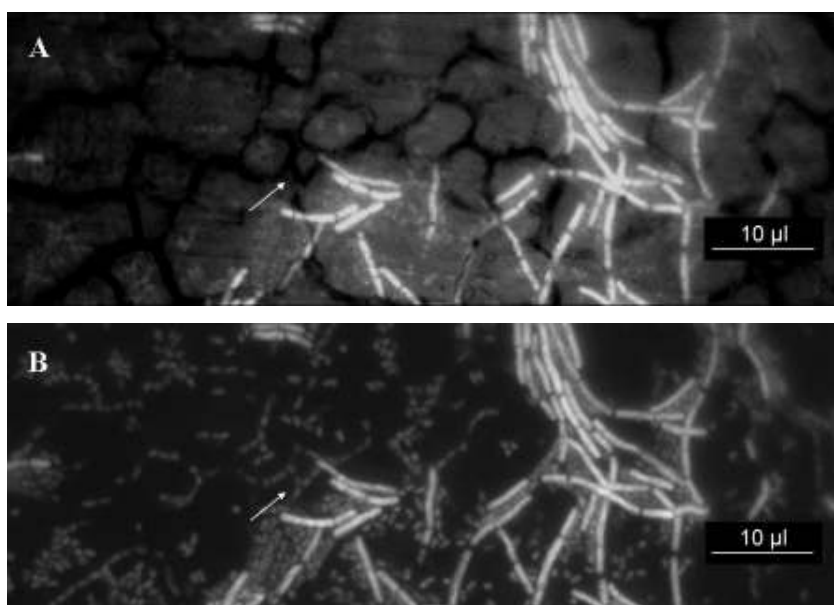
8. táblázat: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb) és *P. fluorescens* (Ps) által borított terület nagysága egyedi és kevert tenyészetben. Kiindulási koncentrációk: $4\text{-}5 \times 10^7$ TKE/ml. Átlag \pm S.E.M.

| A kísérlet sorszám | Lb egyedi tenyészetben (borítottság %) | Ps egyedi tenyészetben (borítottság %) | Lb kevert tenyészetben (borítottság %) | Ps kevert tenyészetben (borítottság %) |
|--------------------|--|--|--|--|
| 1. | $5,46 \pm 1,09$ | $5,81 \pm 0,62$ | $12,12 \pm 1,10$ | $8,06 \pm 1,30$ |
| 2. | $11,30 \pm 0,57$ | $6,95 \pm 0,45$ | $9,66 \pm 0,67$ | $7,07 \pm 1,47$ |
| 3. | $7,41 \pm 1,17$ | $4,13 \pm 0,53$ | $0,30 \pm 0,14$ | $6,10 \pm 0,81$ |
| 4. | $3,16 \pm 0,34$ | $4,90 \pm 0,26$ | $0,42 \pm 0,06$ | $8,30 \pm 1,00$ |
| Eredmények átlaga | $6,83 \pm 0,63$ | $5,45 \pm 0,29$ | $11,0 \pm 0,74$ (1-2. kísérlet) $0,36 \pm 0,07$ (3-4. kísérlet) | $7,39 \pm 0,56$ |

A *P. fluorescens* általi borítottság egyedi tenyészetben 4,13% - 6,95%, kevert tenyészetben 6,1% - 8,3% között változott. Annak ellenére, hogy a *P. fluorescens* két nagyságrenddel nagyobb mennyiségben tapadt a kuponhoz, mint a tejsavbaktérium, ez a jelentős különbség nem tükröződött a borítottság értékekben, mivel a *Lactobacillus*-ok jóval nagyobb méretű baktériumok. Emellett a tejsavbaktériumok esetében megfigyelhető volt, hogy láncokban és gyakran csomókban tapadt az acélhoz (5. ábra), amelyekből lerázás után csak egy kolónia képződhetett a táptalajban, ami alábecsülhette a tényleges sejtszámot. A négy kísérlet átlagát összehasonlítva megállapítható, hogy a *P. fluorescens* kb. 2 százalékponttal nagyobb borítottságot eredményezett a kevert tenyészet esetében. Statisztikai vizsgálatnak ennél a detektálási módszernél is csak a *Pseudomonas* tapadási értékeit vettem alá, minthogy a

Lactobacillus nem adott reprodukálható eredményeket. Az egyedi és kevert tenyészetben mért tapadásokat két szempontos varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztem, ahol a kísérletek random faktorként, a borítottsági százalékok pedig fix faktorként szerepeltek. A statisztikai próba alapján megállapítottam, hogy kevert tenyészetben szignifikánsan több *Pseudomonas* sejt tapadt a kuponhoz, mint egyedi tenyészetben ($p=0,001$, a 95%-os konfidencia intervallum 0,86%-3,18%). Ez az eredmény összhangban volt a tenyésztési eredményekkel, és arra utalt, hogy a tejsavbaktérium segítette a *P. fluorescens* tapadását rozsdamentes acélhoz.

Az élelmiszeriparban leggyakrabban a rozsdamentes acélt használják az élelmiszerrel érintkező felületek borítására, mivel a rozsdamentes acél fizikailag és kémiaiilag stabil (inert) a különböző élelmiszer feldolgozási hőmérsékleteken, könnyű tisztítani és jól ellenáll a korróziónak [STONE & ZOTTOLA 1985]. A rozsdamentes acél mikroszerkezete azonban – ellentétben makroszkópos megjelenésével – repedésekkel, hasadékokkal tagolt (3. ábra), amely tapadási helyeket kínál a baktériumoknak és megvédi őket az áramló folyadékban rájuk ható nyíró erőktől [ZOTTOLA & SASAHARA 1994]. Ebben a vizsgálatban a *Pseudomonas* sejteknél tapasztaltam a hasadékokba való beletapadást. Ugyanez nem volt megfigyelhető a tejsavbaktériumoknál, amelyek méretükből adódóan nem fértek el a rozsdamentes acél repedéseiben (5. ábra).



5. ábra: *P. fluorescens* tapadása rozsdamentes acélhoz *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mellett. A fehér nyíl egy olyan négyszög alakú hasadékra mutat, amelybe *Pseudomonas* sejtek tapadtak bele. A: CY3/TRI szűrővel készült felvétel, B: GFP/FITC szűrővel készült felvétel.

5.1.2. Baktériumtapadás vizsgálata függőleges helyzetű kuponon - *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* és *L. monocytogenes* kölcsönhatása

5.1.2.1. A tapadó baktériumok élő csíraszámának meghatározása lemezöntéssel

A *Lactobacillus*-ok mind az egyedi, mind a *L. monocytogenes*-szel kevert tenyészetben 10^3 - 10^4 TKE/cm² nagyságrendben tapadtak a rozsdamentes acélhoz (9. táblázat). A 5.1.1. pontban ismertetett eredményeket is figyelembe véve ez azt jelenti, hogy a tejsavbaktériumok egy része kipusztult/nem tenyészthető állapotba került vagy kiülepedett a szuszpenzióból, még mielőtt kitapadhatott volna.

9. táblázat: A kuponokról lerázott *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Lb) és *L. monocytogenes* (Lm) élő csíraszama egyedi és kevert tenyészetben. Kiindulási koncentrációk: $4-5 \times 10^7$ TKE/ml (Lb) és $8-9 \times 10^7$ TKE/ml (Lm).

| A kísérlet sorszama | Lb egyedi tenyészetben (LogTKE/cm ²) | Lm egyedi tenyészetben (LogTKE/cm ²) | Lb kevert tenyészetben (LogTKE/cm ²) | Lm kevert tenyészetben (LogTKE/cm ²) |
|---------------------|--|--|--|--|
| 1. | 3,7 | 6,1 | 3,4 | 5,9 |
| 2. | 3,7 | 6,2 | 2,9 | 6,5 |
| 3. | 4,0 | 6,5 | 4,4 | 6,2 |
| Eredmények átlaga | 3,8 | 6,3 | 4,0 | 6,3 |

A *L. monocytogenes* mind az egyedi, mind a *Lactobacillus*-szal kevert tenyészetben – 10^6 TKE/cm² nagyságrendben tapadt, azaz a sejtek csupán kb. 1%-a kötődött az acélfelülethez. Ez csupán egytized része a *P. fluorescens*-nél mért tapadásnak. SASAHARA és ZOTTOLA [1993] átfolyó rendszerben vizsgálta a baktériumtapadást és azt tapasztalta, hogy a *L. monocytogenes* alig tapadt a felszínhez (üveg) egyedi tenyészetben, és nem képzett mikrokolóniákat sem, amit a szerzők az EPS képzés hiányával magyaráztak. Ugyanakkor *Pseudomonas fragi* jelenlétében a *Listeria* sejtek beletapadtak a *Pseudomonas* által termelt EPS mátrixba és képesek voltak mikrokolóniákat képezni, alátámasztva, hogy a *L. monocytogenes*-nek elsődleges biofilm képző mikroorganizmusokra van szüksége, hogy a különböző felületeket kolonizálni tudja. Hasonló eredményeket kaptak KALMOKOFF és munkatársai [2001] rozsdamentes acélon tripton-szója táplevesben (TSB) rövid időtartamú (2 órás) tapadási kísérletben: a *L. monocytogenes* törzsek kisebb mértékű (kb. 1%-os) tapadást mutattak, mint a legtöbb – Gram-pozitív és Gram-negatív – baktérium izolátum és csupán egyedi sejtekként tapadtak a felszínhez. BORUCKI és munkatársai [2003] szerint azonban

néhány *L. monocytogenes* törzs képes érett biofilm képzésére is. A jó biofilm-képzők rendszerint perzisztens törzsek, amelyek állandóan jelen vannak az üzemben, szemben a nem perzisztens, átmeneti törzsekkel. A tanulmány szintén kimutatta, hogy a II. osztályba (1/2a és 1/2c szerotípusok) tartozó törzsek jobb biofilm képzők, mint az I. osztályba (1/2b és 4b szerotípusok) tartozók. A vizsgálataimban felhasznált törzs tej eredetű, perzisztáló képességével kapcsolatban nincsenek adatok. Azonban ismert, hogy a 4b szerotípusba tartozik, ami összhangban van a gyenge tapadási képességével. JASSIM és munkatársai [2005] szintén 4b szerotípusba tartozó *L. monocytogenes* törzs tapadását vizsgálták TSB-ben: 18 órás inkubálás után 30°C-on a baktériumok csupán 0,8%-a tapadt a rozsdamentes acélhoz. A tapadás kezdeti szakaszában jelentős szerepe van a flagellával történő mozgásnak, ami segíti a baktériumot a felszínhez való eljutásban [LUNDEN et al. 2000]. A *L. monocytogenes* hőmérséklet-függő flagellaképzést mutat: 20-25 °C között peritrich flagellát szintetizál, motilis, 35°C fölött azonban nem motilis és csak kevés flagellája van [VATANYOOPAISARN et al. 2000]. A kismértékű tapadás tehát feltehetően összefügg a korlátozott flagellaképzéssel és motilitás csökkenéssel is, ami a kísérletem során alkalmazott 30°C-os inkubálás hatására következett be. Emellett - összehasonlítva a *Pseudomonas*-ok poláris flagellájával, amellyel egyenes vonalú mozgásra képes a baktérium - a *Listeria*-k peritrich flagellái csupán bukfencező, bukducsoló mozgást tesznek lehetővé, ami sem a haladás, sem a megtapadás szempontjából nem ideális.

A tejsavbaktériumot ebben a kísérlet sorozatban sem vontam be a statisztikai vizsgálatba. A *L. monocytogenes* tapadásának statisztikai értékelésére itt is Poisson-eloszlást alkalmaztam (10. táblázat). A próba elvégzése után megállapítottam, hogy kevert tenyészetben szignifikánsan kevesebb *Listeria* sejt tapad a kuponhoz, mint egyedi tenyészetben ($p=0,0001$). Ugyanakkor tekintettel arra, hogy az eltérés mértéke csupán $3,04 \times 10^6$ TKE/ml, ráadásul ilyen mértékű ingadozások a telepszámban az egyes ismétlések között is megfigyelhetők, a különbséget itt sem tekintettem relevánsnak.

10. táblázat: *L. monocytogenes* egyedi (Lm) és kevert (Lm (+Lb)) tenyészetben mért tapadásának statisztikai vizsgálata. Kiindulási koncentráció: $8-9 \times 10^7$ TKE/ml, $n=3$.

| Kísérleti beállítás | Átlag (TKE/ml) | Átlagok közti különbség | 95%-os konfidencia intervallum | | p érték |
|---------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------|---------|
| Lm | $2,00 \times 10^6$ | $3,04 \times 10^5$ | $1,35 \times 10^5$ | $4,73 \times 10^5$ | 0,0001 |
| Lm (+Lb) | $1,70 \times 10^6$ | | | | |

5.1.2.2. A tapadó baktériumok mikroszkópos vizsgálata

A mikroszkópos vizsgálatok szerint (11. táblázat) a *Lactobacillus*-ok egyedi tenyészetben elenyésző mértékben tapadtak az acélkuponhoz, kevert tenyészetben pedig egyáltalán nem voltak kimutathatók. Ez összhangban van a lemezöntéses eredményekkel, amelyek szerint a tejsavbaktériumok 10^4 TKE/cm² nagyságrendben tapadtak a kupon felületéhez, ami a mikroszkópos detektálási módszer kimutatási határértéke alatti csíraszám. A mért borítottsági százalék értékek így kizárólag a *L. monocytogenes* általi borítottságot jelentik a kevert tenyészet esetében. A *L. monocytogenes* mind egyedi, mind kevert tenyészetben csupán 1% körüli borítottságot adott.

11. táblázat: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb) és *L. monocytogenes* (Lm) által borított terület nagysága egyedi és kevert tenyészetben. Kiindulási koncentrációk: $4-5 \times 10^7$ TKE/ml (Lb) és $8-9 \times 10^7$ TKE/ml (Lm). Átlag \pm S.E.M.

| A kísérlet sorszáma | Lb egyedi tenyészetben (borítottság %) | Lm egyedi tenyészetben (borítottság %) | Lb és Lm kevert tenyészetben (borítottság %) |
|---------------------|--|--|--|
| 1. | 0,67 \pm 0,27 | 1,13 \pm 0,48 | 0,34 \pm 0,09 |
| 2. | 0,31 \pm 0,39 | 0,69 \pm 0,23 | 1,22 \pm 0,76 |
| 3. | 0 | 1,41 \pm 0,68 | 0,69 \pm 0,13 |
| Eredmények átlaga | 0,33 \pm 0,38 | 1,08 \pm 0,57 | 0,75 \pm 0,57 |

Statisztikai vizsgálatnak ennél a detektálási módszernél is csak a *Listeria* tapadási értékeit vettem alá. Az egyedi és kevert tenyészetben mért tapadásokat két szempontos varianciaanalízissel (ANOVA) végeztem az 5.1.1. pontban leírt módon. A statisztikai próba alapján megállapítottam, hogy kevert tenyészetben szignifikánsan kevesebb *Listeria* sejt tapadt a kuponhoz, mint egyedi tenyészetben ($p=0,027$, a 95%-os konfidencia intervallum 0,04%-0,62% közé esik). Ez az eredmény összhangban volt a tenyésztéses eredményekkel, azonban feltehetően nem a tejsavbaktériumok hatásának volt köszönhető, mivel azok – a lemezöntés tanúsága szerint – legalább két nagyságrenddel kisebb számban voltak csak jelen a kupon felületén.

5.1.3. Baktériumtapadás vizsgálata vízszintes helyzetű kuponon

A függőleges helyzetű kuponon történő vizsgálatok nem adtak értékelhető eredményeket a baktériumok kölcsönhatása szempontjából, mivel a *Lactobacillus*-ok tapadását nem sikerült reprodukálható módon lemérni. Ezért - CHAE és SCHRAFT [2001] munkáját alapul véve – vízszintesre változtattam a kuponok helyzetét. A tapadásvizsgálatot két ismétlésben végeztem el, minden kísérletben két kupont használtam.

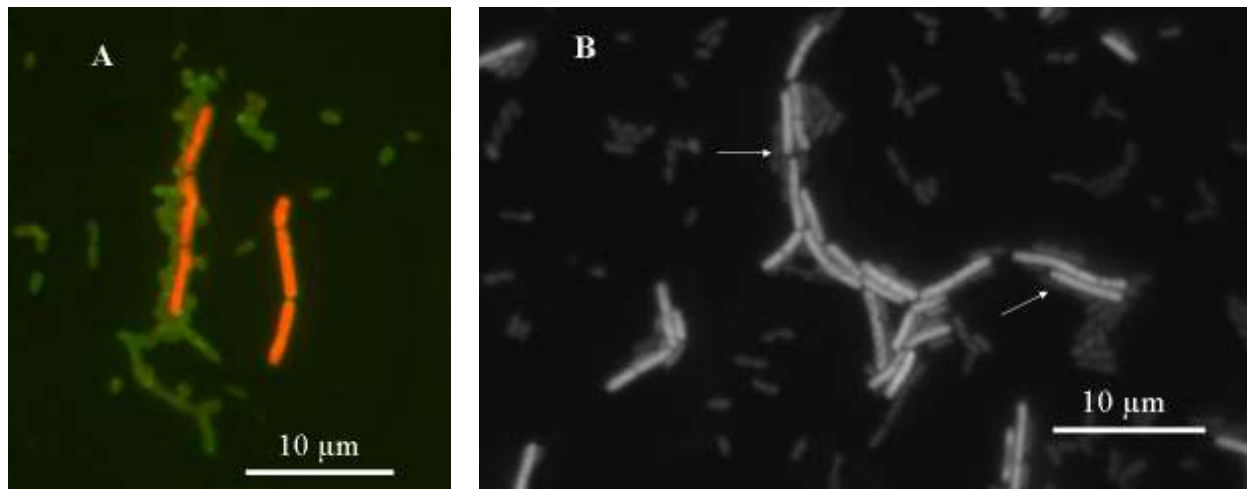
5.1.3.1. A tapadó baktériumok mikroszkópos vizsgálata

Az eredmények értékelése során a tapadó baktériumok számát hasonlítottam össze a két ismétlés összevonása után. Az összehasonlítást Welch-próbával végeztem. Grafikusan ellenőriztem a sejtszámok eloszlását, hogy közelítőleg normális-e, bár ennek nincs nagy jelentősége ilyen nagy mintaelem-számoknál (40 megfigyelés). Az értékelést a 12. táblázatban tüntettem fel. A *Lactobacillus* tapadásának mértéke hasonló volt az egyedi és a két kevert tenyészetben, azonban statisztikailag kimutatható eltérés volt a *P. fluorescens* jelenlétében, ami arra utal, hogy a romlást okozó baktérium kis mértékben ugyan, de gátolta a tejsavbaktérium tapadását. Ezzel szemben mind a *P. fluorescens*, mind a *L. monocytogenes* nagyobb mértékben tapadt a tejsavbaktérium mellett, mint egyedül.

12. táblázat: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb), *L. monocytogenes* (Lm) és *P. fluorescens* (Ps) egyedi és kevert tenyészetben mért tapadásának statisztikai vizsgálata. Zárójelben az a baktérium látható, amelynek jelenlétében az adott törzs sejtszámát megadtam kevert tenyészetek esetén. NS – nem szignifikáns. n=2

| Kísérleti beállítás | Átlag (baktérium/látómező) | Átlagok közötti különbség | p érték | 95%-os konfidencia intervallum | |
|---------------------|----------------------------|---------------------------|---------|--------------------------------|-------|
| Lb | 199,00 | 61,85 | 0,00001 | 37,73 | 85,97 |
| Lb (+Ps) | 137,15 | | | | |
| Lb | 199,00 | 22,07 | NS | | |
| Lb (+Lm) | 176,93 | | | | |
| Lb (+Ps) | 137,15 | 39,78 | 0,001 | 17,32 | 62,23 |
| Lb (+Lm) | 176,93 | | | | |
| Ps | 54,31 | 343,39 | 0,00001 | 317,9 | 368,9 |
| Ps (+Lb) | 397,70 | | | | |
| Lm | 29,58 | 149,42 | 0,00001 | 129,9 | 168,9 |
| Lm (+Lb) | 179,00 | | | | |

A mikroszkópos felvételek tanúsága szerint a *Pseudomonas* és *Listeria* sejtek nem csupán az acél felületéhez tapadtak, hanem magukhoz a tejsavbaktériumokhoz is; feltehetőleg ezzel segítette elő a *Lactobacillus* a romlás/kórokozó baktériumok tapadását (7. ábra).



7. ábra: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* és *P. fluorescens* tapadása rozsdamentes acélhoz kevert tenyészetben. Hosszú pálcák – *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, rövid pálcák - *P. fluorescens*. A 7/B ábrán a fehér nyílak tejsavbaktériumokhoz tapadó *Pseudomonas* sejtekre mutatnak. Az 7/A ábrát fotózás után színeztem az Openlab program segítségével. GFP/FITC szűrővel készült felvételek.

A kísérlet eredménye tehát nem támasztotta alá azt a feltételezést, hogy a tejsavbaktériumok, a tapadási felület elfoglalása által gátolják káros mikroorganizmusok adhézióját, hanem éppen ellenkezőleg, tapadási felületet biztosítottak számukra. CARPENTIER és CHASSAING [2004] 29 – többségében élelmiszerüzemi felületekről izolált – baktérium törzs jelenlétének hatását vizsgálta *L. monocytogenes* törzsek tapadására hígított TSB-YE/20 (élesztőkivonattal kiegészített tripton-szója) tápvesben és azt találta, hogy az „üzemi flóra” törzsek közül 16 csökkentette, 4 pedig növelte a kórokozók biofilm képzésének mértékét. A pozitív hatás – ami a szerzők szerint lehet a *L. monocytogenes* tapadásának és/vagy szaporodásának elősegítése is – kiváltható volt az „üzemi flóra” törzsek sejtmentes felülűszóival is, ami arra utal, hogy az üzemi baktériumok valamely anyagcsere terméke befolyásolta a biofilm képzést. Ezen kívül három (Gram-pozitív) törzs esetében megfigyelték, hogy a *Listeria* sejtek az üzemi baktériumok által képzett mikrokolóniák köré rendeződtek, azaz a kórokozó adhéziójának növekedését ebben az esetben a baktériumok koaggregációja okozhatta. Kísérletemben a baktériumokat PBS pufferben szuszpendáltam, így anyagcseréjük erősen gátolva volt – különösen a tejsavbaktériumoké, amelyek tápanyag ellátás szempontjából rendkívül igényesek – ami ugyancsak alátámasztja, hogy a romlás/kórokozó baktériumok tapadásának növekedését nem metabolitok, hanem a tejsavbaktériumokkal való koaggregáció okozta.

Emellett a 3 órás inkubálási idő – szemben a fenti kísérletben alkalmazott 3 + 20 órás inkubálási idővel – sem lett volna elegendő megfelelő mennyiségű metabolit képzésére. Érdeemes megemlíteni, hogy a tanulmányban használt, azonosított izolátumok között nem volt egy tejsavbaktérium törzs sem. ZHAO és munkatársai [2004] ugyanakkor 413 „üzemi flóra” törzset izolált és tesztelt antiliszteriás hatásuk szempontjából és azt találta, hogy a kifejezett *Listeria*-ellenes hatással csupán 9 tejsavbaktérium izolátum (*Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, illetve *Lactobacillus plantarum*-ként meghatározott faj) rendelkezett. LERICHE és CARPENTIER [2000] egy *L. monocytogenes*-t gátló *Staphylococcus sciuri* törzset vizsgált és megállapította, hogy egy napos inkubálás után a tapadást főként a *S. sciuri* által termelt exopoliszacharidok gátolják. Három napos inkubálás után már jelentős hatása volt a tápanyagokért folyó versengésnek is. COOLEY és munkatársai [2006] szerint, akik növényi epifita baktériumok hatását vizsgálták *E. coli* O157:H7 túlélésére és növekedésére saláta növényen, a versengés nem a tapadási helyért, hanem az elérhető tápanyagokért folyik. Kísérleteikben az epifiták nem befolyásolták az *E. coli* kezdeti megkötődését, ugyanakkor sikeresen versengtek az *E. coli*-val a tápanyagokért. A kórokozó csíraszámát azonban csak az azonos szénforrást hasznosító fajok voltak képesek csökkenteni. BANKS és BRYERS [1991] *P. putida* és *Hyphomicrobium* sp. törzsek vegyes kultúráin végzett megfigyelései szerint a biofilmben a gyorsabban szaporodó baktérium törzs dominál, függetlenül attól, hogy melyik törzs került először a felületre. *Lactobacillus*-ok esetében VELRAEDS és munkatársai [1996] azt írták le, hogy a tejsavbaktériumok által termelt bio-felületaktív anyagok gátolják uropatogén *Enterococcus faecalis* kezdeti tapadását. LERICHE és munkatársai [1999] tanulmánya szerint hatékonyan lehetett gátolni a *L. monocytogenes*-t nizin-termelő *Lactococcus lactis*-szal rozsdamentes acélon amennyiben a kórokozó csíraszám maximum 10^7 TKE/ml. Ennél nagyobb csíraszám esetén ugyanis a kezdeti csíraszám esés után a *L. monocytogenes* száma 10^5 - 10^6 TKE/cm² számban stabilizálódott a biofilmben, alátámasztva azt a korábbi megfigyelést, hogy a nizin kezelést túlélő sejtek rezisztenssé válnak a bakteriocin sokkal koncentráltabb oldatára is. A tanulmány szerint a nizint nem termelő *Lactococcus* törzsnek szintén volt antiliszteriás hatása, ami a tápanyagok kimerítésével és a közeg savanyításával volt magyarázható.

A biológiai kontroll során tehát a kompetitív mikroflóra több ponton gátolhatja a romlás/kórokozó mikrobák biofilm képzését: akadályozhatja a megtapadásukat illetve elősegítheti a leválásukat a felszínről, gátolhatja a szaporodásukat. Az antimikrobás metabolitok (pl. bakteriocinek, szerves savak) termelése és a tápanyagokért való versengés (ide értve a sziderofórok termelését is) elsősorban a káros mikroorganizmusok szaporodását gátolják illetve elpusztítják azokat. Az EPS vagy a felületaktív anyagok a romlás/kórokozó

mikrobák megtapadását akadályozzák. Figyelembe kell venni ugyanakkor, hogy a felületet kolonizáló mikrobák között egymást segítő kölcsönhatások is létrejönnek és ennek a „nem kívánatos” mikrobák is részesei lehetnek. Vizsgálataimat - tápanyagokat nem tartalmazó - oldatban végeztem, amelyben a különféle antimikrobás (és egyéb) metabolitok termelése illetve az EPS képzés is gátolt volt, a tejsavbaktériumok pusztája jelenléte pedig nem gátolta, hanem a koagreció miatt támogatta a romlás/kórokozó baktériumok megtapadását. A baktériumok térbeli közelsége azonban előnyt jelenthet, amennyiben a tejsavbaktériumok képesek anyagcserét folytatni.

5.2. Baktériumtapadás vizsgálata bélhámsejteken

5.2.1. Tapadásvizsgálat különböző detektálási módszerekkel

A 13. táblázat a hozzáadott valamint a tapadó baktériumok számát mutatja egy-egy lyukra vonatkoztatva, amelyet lemezöntéssel és – Gram festést követően – sejtszámlálással állapítottam meg a három vizsgált baktérium törzs esetében. A tapadó baktériumok nem homogéne oszlottak el a sejtenyészlet felületén, emiatt a standard hiba nagy lett a sejtszámlálás esetében.

13. táblázat: A hozzáadott és a tapadó baktériumok száma/lyuk. Sejtszámlálás a Gram szerint festett készítményeken. Átlag \pm S.E.M., n=2

| Baktérium törzsek | Hozzáadott baktériumok ($\times 10^5$) | Tapadó baktériumok száma ($\times 10^5$) és A tapadás mértéke (%) | |
|---|--|---|----------------------------|
| | | Lemezöntés | Sejtszámlálás |
| <i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> 2750 | 56,8 \pm 11,3 | 6,65 \pm 0,70 (11,7%) | 33,5 \pm 6,36 (59,0%) |
| <i>Lb. sakei</i> DSM20017 | 165 \pm 24,5 | 12,3 \pm 0,21 (7,5%) | 22,4 \pm 2,11 (13,6%) |
| <i>B. bifidum</i> B3.2 | 130 \pm 60,5 | 3,93 \pm 1,32 (3,0%) | 4,77 \pm 1,47 (3,7%) |

A két detektálási módszert Mann-Whitney próbával összehasonlítva, szignifikáns különbséget kaptam a 2750-es törzsnél. A detektálási módszereket a biofilm vizsgálatoknál alkalmazott statisztikai értékeléssel is összehasonlítottam: a lemezöntéssel kapott értékekre Poisson-modellt alkalmaztam és ebből határoztam meg a standard hibát, a sejtszámlálás esetében

magából a mintából számoltam ki a standard hibát (14. táblázat). Ezzel a statisztikai próbával szignifikáns különbséget kaptam a DSM20017-es törzs esetében is. A lemezöntéses csíraszám meghatározás érzékeny kimutatási módszer, azonban nem megfelelő az aggregátumképzésre hajlamos baktériumok esetében, mivel az aggregátumokból később csak egy-egy telep nő ki a táptalajon és ezért alábecsülheti a tapadó baktériumok számát [LE BLAY et al. 2004]. A 2750-es törzs esetében erős aggregátumképző hajlamot figyeltem meg (8/A ábra). A *Lb. sakei* és a *B. bifidum* sejtek sokkal inkább elkülönülten tapadtak (8/B és 8/C ábrák), ezáltal kisebb különbségek jelentkeztek a lemezöntéssel illetve sejtszámlálással kapott eredményekben. A tenyésztéses csíraszám meghatározás másik hátránya, hogy nem mutatja ki azokat a sejteket, amelyek elpusztultak, vagy megsérültek és ezért kitenyészthetlenné váltak a kísérlet folyamán [VESTERLUND et al. 2005]. A lemezöntéssel kapott kisebb tapadó baktérium számot ezért ez is magyarázhatta. A baktérium-aggregátumok képződése nem csak a Caco-2 sejtek felületén, hanem valószínűleg már a szuszpenzióban megtörtént, különös tekintettel arra, hogy a tapadás vizsgálatot megelőzően a baktériumokat többször centrifugáltam. A baktériumcsomók letapadása ebben az esetben jelentősen megnövelte a tapadás mértékét – elsősorban a 2750-es törzs esetében – így a valóságosnál nagyobb mértékű adhéziót tapasztaltam. Ebből a szempontból a lemezöntéses módszer valószínűleg reálisabb eredményt adott, mint a sejtszámlálás. Irodalmi adatok szerint szoros összefüggés van egyes *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek autoaggregációra és adhézióra való képessége között [DEL RE et al. 2000, KOS et al. 2003]. Ezért - bár az aggregátum képző hajlam nehezítheti a velük való kísérletes munkát – ezek a törzsek ígéretes potenciális probiotikus mikrobák lehetnek.

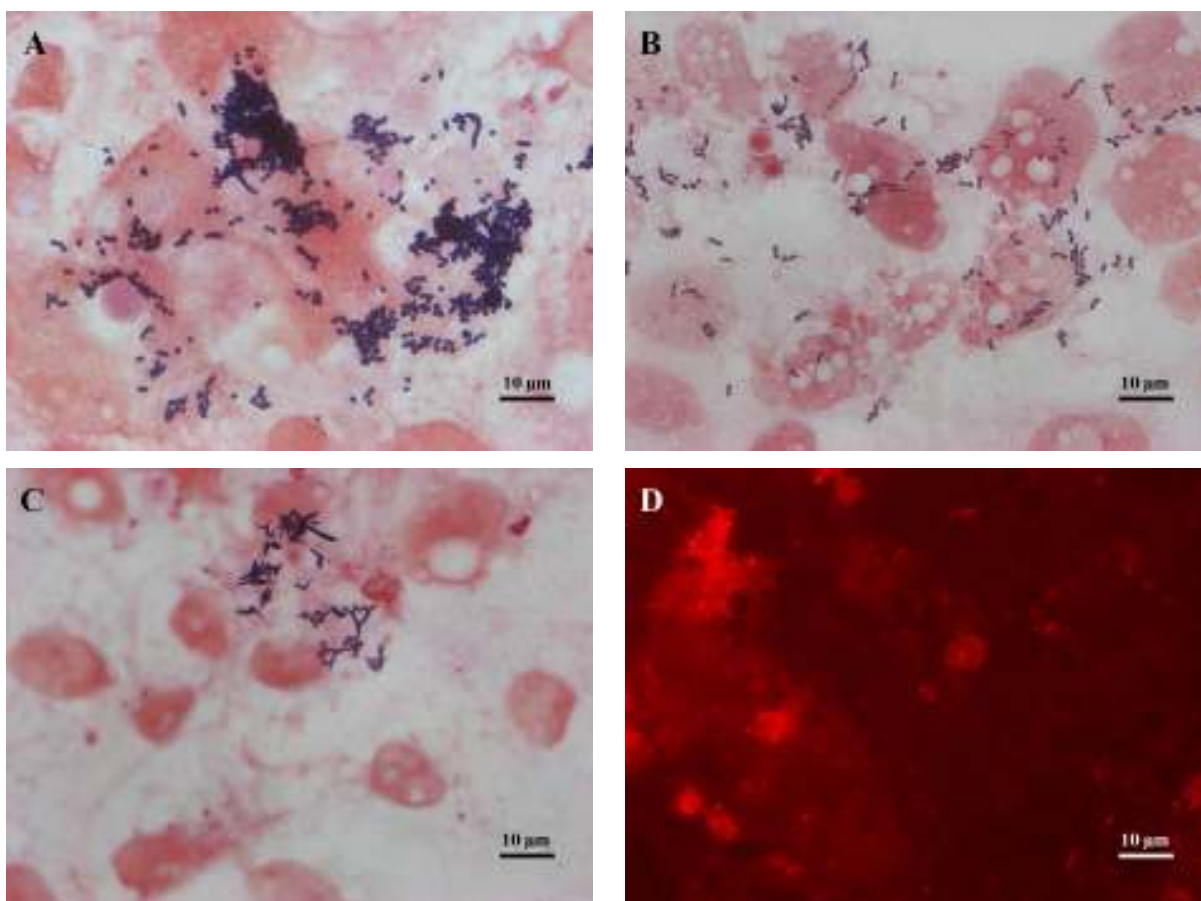
14. ábra: Detektálási módszerek közti különbségek statisztikai vizsgálata. Kiindulási koncentráció kb. 10^7 baktérium/lyuk, n=2

| Törzs | Lemezöntés átlag (TKE/lyuk) | Sejtszámlálás átlag (TKE/lyuk) | Átlagok közti különbség | 95%-os konfidencia intervallum | | p érték |
|----------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------|---------|
| | | | | | | |
| 2750 | $6,65 \times 10^5$ | $3,35 \times 10^6$ | $2,69 \times 10^6$ | $1,44 \times 10^5$ | $3,94 \times 10^5$ | 0.0001 |
| DSM20017 | $1,23 \times 10^6$ | $2,24 \times 10^6$ | $1,01 \times 10^6$ | $5,89 \times 10^5$ | $1,43 \times 10^6$ | 0.0001 |
| B3.2 | $3,93 \times 10^5$ | $4,77 \times 10^5$ | $8,4 \times 10^4$ | $-2,08 \times 10^5$ | $3,76 \times 10^5$ | NS |

NS – nem szignifikáns

A hexidium-jodiddal festett mikroszkópos készítményeken a baktériumok mellett a Caco-2 sejtek egyes sejtalkotói (elsősorban a sejtmagok) is látszódtak és ezek a műtermékek zavarták

a kiértékelést (8/D ábra). A hexidium-jodid egy nem specifikus nukleinsav-festék, amely a Caco-2 sejtek nukleinsavaihoz is kötődött, mivel az alapos (négyseri) mosás ellenére is maradhattak festéknyomok a baktérium szuszpenzióban. A hexidium-jodiddal történő fluoreszcens festés emiatt nem bizonyult megfelelő festési eljárásnak ebben a modell kísérletben. Ennek ellenére a fluoreszcencián alapuló technikák ígéretes módszerek a bélhámsejtekhez tapadó baktériumok detektálásában. BIANCHI és munkatársai [2004] például sikeresen alkalmazták a karboxifluorescein diacetátot (cFDA) baktériumok fluoreszcens jelölésére: ebben az esetben a fluoreszcens termék a cFDA észterázos hasítása során képződik a baktériumokban. Hasonlóképpen megfelelő, specifikus módszerek bizonyultak a baktériumok jelölésére, hogy a fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein, GFP) génjét tartalmazó plazmiddal transzformálták a vizsgálni kívánt baktériumokat [VESTERLUND et al. 2005, SCHULTZ et al. 2005]. A további kiértékelésekben ezért a Gram szerint festett készítményt használtam fel.



8. ábra: *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek tapadása Caco-2 sejtekhez. 8/A és D: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2750, 8/B: *Lb. sakei* DSM20017, 8/C: *B. bifidum* B3.2. 8/A-C Gram-szerint festett készítmények, 8/D hexidium-jodiddal festett készítmény

15. táblázat: A bélhámsejtekhez tapadó baktériumok mennyisége a Gram szerint festett készítményeken, a borítottság mértékében kifejezve (borítottsági %). Átlag \pm S.E.M., n=2

| Törzs | Tapadó baktériumok (borítottsági %) |
|------------------------|--|
| <i>Lb. casei</i> 2750 | 2,53 \pm 0,44 |
| <i>Lb. sakei</i> | 1,40 \pm 0,14 |
| <i>B. bifidum</i> B3.2 | 0,54 \pm 0,15 |

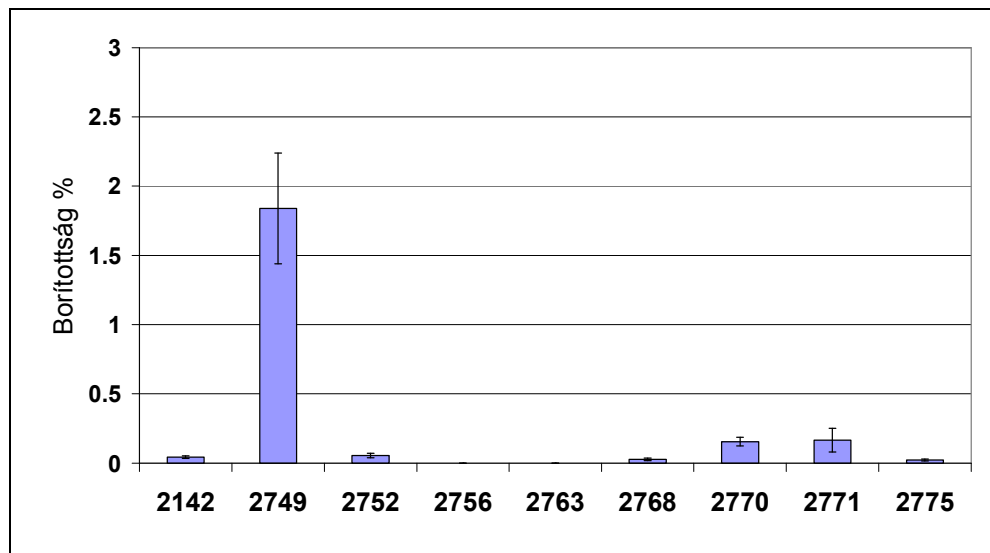
A továbbiakban meghatároztam a tapadó baktériumok által borított terület százalékos arányát, azaz a borítottság %-ot (15. táblázat), valamint a baktériumszám és a borítottsági % közötti összefüggést (16. táblázat). Ez az összefüggés mindhárom baktériumtörzs esetében lineárisnak adódott és a regressziós koefficiens szoros összefüggést mutatott. Ebből arra következtettem, hogy a borítottsági % értékek is alkalmasak arra, hogy a törzsek adhézions képességét összehasonlítsam, feltételezve, hogy a baktérium sejtek hasonló méretűek. A legkevésbé szoros összefüggést a *B. bifidum* esetében tapasztaltam ($R^2=0.9163$), ami arra utal, hogy a sejtek különböző méretűek (8/C ábra).

16. táblázat: A bélhámsejteken tapadó baktériumok száma és a borítottsági % közötti összefüggés a Gram szerint festett készítményeken. x érték: baktériumok száma/látómező, y érték: borítottság %, n=2

| Törzsek | Egyenes egyenlete | Regressziós koefficiens (R^2) |
|------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| <i>Lb. casei</i> 2750 | $y = 0.0169x + 0.2479$ | 0.9767 |
| <i>Lb. sakei</i> | $y = 0.0105x + 0.128$ | 0.9485 |
| <i>B. bifidum</i> B3.2 | $y = 0.023x + 0.0386$ | 0.9163 |

5.2.2. *Lactobacillus* törzsek tapadásának tesztelése

A 9. ábrán a tesztelt tejsavbaktérium törzsek tapadásának mértékét ábrázoltam, melyet a borítottság %-ában adtam meg. A törzsek közül a *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 bizonyult a legjobban tapadó tejsavbaktériumnak (1,84% borítottság), ezért ezt a törzset választottam ki a további vizsgálataimhoz.



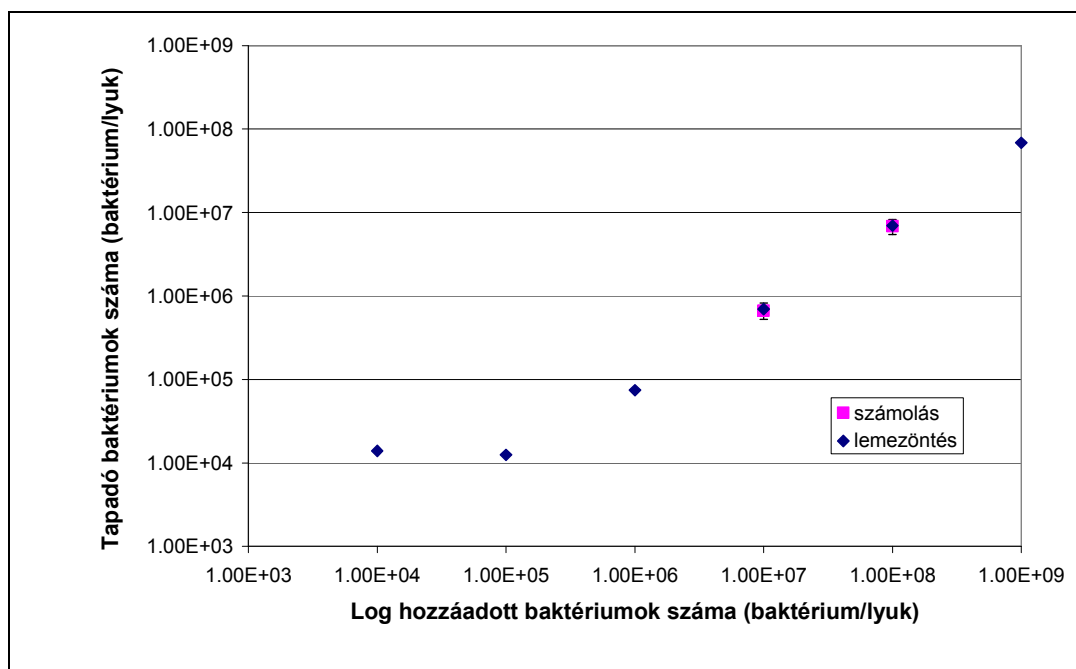
9. ábra: Tejsavbaktérium törzsek tapadása Caco-2 sejtekhez. Átlag \pm S.E.M., n=2

A probiotikus mikroorganizmusok jótékony hatásaik jelentős részét csak akkor tudják kifejezni, ha képesek megkötődni a bél mukózán. A potenciálisan probiotikus törzsek kiválasztására végzett in vitro előtesztekben ezért fontos szelekciós kritérium a bél mukózához való tapadás képessége. Ennek ellentmond, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható és bizonyítottan probiotikus hatású törzsek között is vannak gyengén tapadók: TUOMOLA (NÉE LEHTO) és SALMINEN [1998] tanulmányában a *Lb. casei* Shirota (Yakult®, Yakult) vagy a *Lb. casei* Imunitas (Actimel®, Danone) Caco-2 sejtekhez való tapadása nem különbözött a vizsgálatában használt negatív kontroll törzs tapadásától. Ez arra enged következtetni, hogy a jótékony hatás létrejön a baktériumok megtapadása nélkül is, illetve, hogy a Caco-2 sejtekhez való tapadás képessége önmagában nem feltétlenül alkalmas a probiotikus törzsek in vivo hatásainak becslésére. Az in vitro tapadási tesztek másik hátránya, hogy a baktériumok adhéziójának mértéke erősen függ a kísérlet körülményeitől, ezért még ugyanannak a törzsnek a tapadása is gyakran eltér a különböző tanulmányokban, megnehezítve az összevetést [BLUM et al. 1999]. Annak ellenére, hogy az in vitro tapadás vizsgálatok eredményei nem alkalmazhatók közvetlenül az in vivo helyzetre, több tanulmány is bizonyítja, hogy a jó tapadóképességű törzsek közül nagyobb valószínűséggel kerülnek ki a bélcsatornát is – legalább átmenetileg – kolonizálni képes törzsek [ZÁRATE et al. 2002]. A törzsek in vivo sikerességét ugyanakkor erősen befolyásolja a bélcsatornában való túlélés és elszaporodás képessége is [CROCIANI et al. 1995, JACOBSEN et al. 1999]. Az általam kiválasztott törzs tehát addig nem nevezhető probiotikusnak (legfeljebb potenciálisan probiotikusnak), amíg in vivo tesztek nem igazolják egészségre kifejtett jótékony hatását. A probiotikumokkal kapcsolatban általában követelmény, hogy humán eredetű legyen [FONDÉN et al. 2003]. Ennek ellenére több tejtermék-eredetű tejsavbaktérium törzsről is

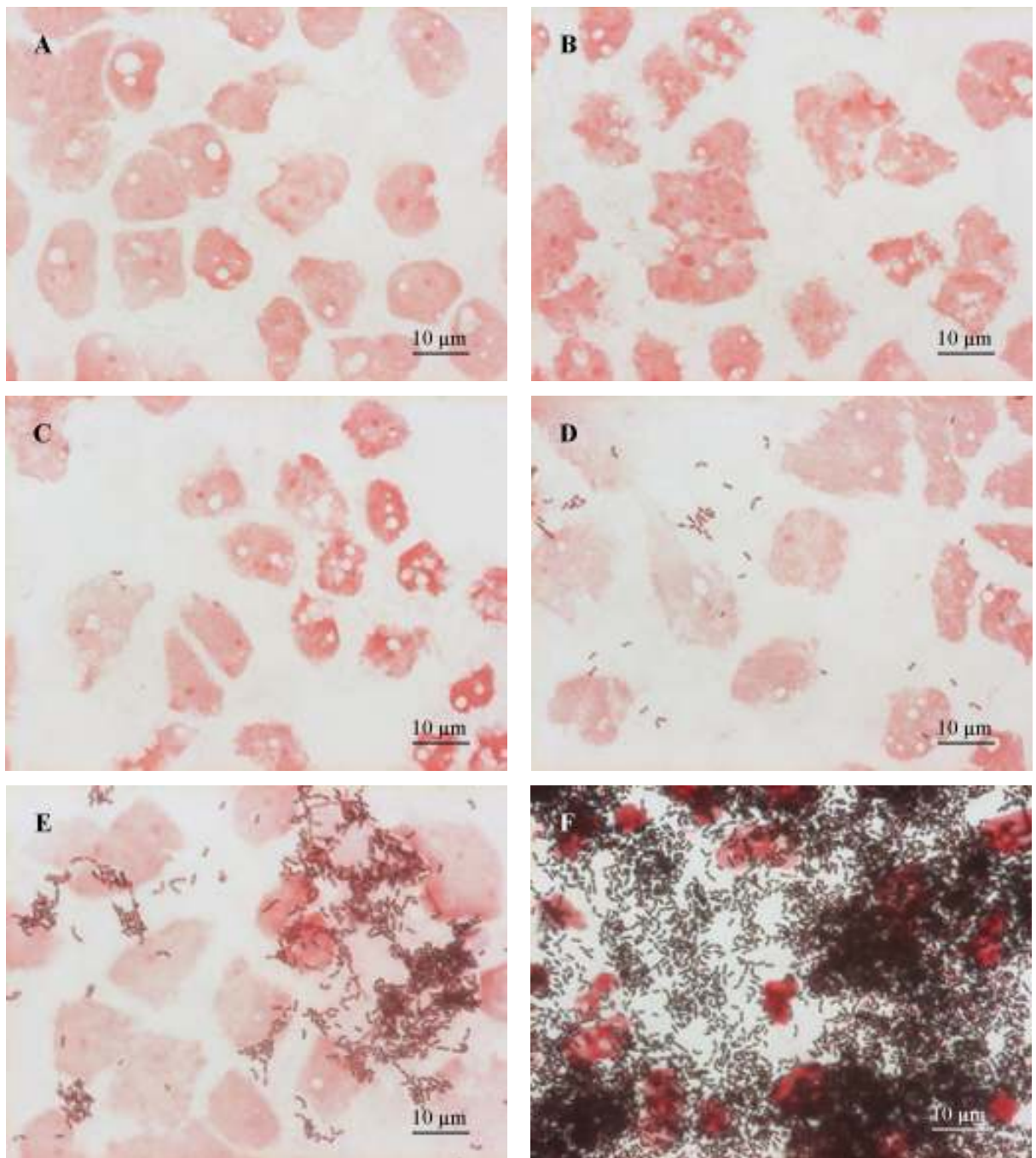
bebizonyosodott, hogy probiotikus tulajdonságokkal – pl. sav- és epetűrés, bélhámsejtekhez való tapadás – rendelkezik [JACOBSEN et al. 1999, KIMOTO et al. 1999, MARAGKOUidakis et al. 2006], ami arra utal, hogy lehetnek jótékony hatásaik in vivo.

5.2.3. *A Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum 2749 törzs tapadásának vizsgálata a kiindulási koncentráció függvényében*

A 10. ábra a *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 törzs tapadásának mértékét mutatja a növekvő hozzáadott baktérium koncentráció függvényében. A tapadó baktériumok detektálását lemezöntéssel valamint Gram-festést követő sejtszámlálással állapítottam meg. Számlálás esetében a teljes lyukra átszámolt tapadó baktérium számot adtam meg az összehasonlíthatóság érdekében. Az eredményekből látható, hogy a mikroszkópos vizsgálati módszerrel szűkebb koncentráció tartományban (10^6 - 10^7) voltak vizsgálhatók a tapadó baktériumok, mint a táptalajon való csíraszám meghatározás esetében: 10^5 baktérium/lyuk tapadás esetén már nem voltak baktériumok a látómezőkön, a 10^8 baktérium/lyuk mennyiség pedig már számolhatatlanul sok volt (11. ábra).



10. ábra: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 törzs tapadása Caco-2 sejtekhez növekvő hozzáadott baktérium koncentráció függvényében. Lemezöntés esetében egy pont 3 párhuzamos adat átlaga, számlálás esetében 15 látómező adata. Átlag \pm S.E.M., n=2



11. ábra: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 törzs tapadása Caco-2 sejtekhez növekvő hozzáadott baktérium koncentráció függvényében. Gram szerint festett készítmények. Hozzáadott baktériumszám: A: 10^4 , B: 10^5 , C: 10^6 , D: 10^7 , E: 10^8 , F: 10^9 TKE/lyuk.

A lemezöntéses csíraszám meghatározás szélesebb koncentráció-tartományt fogott át (10^4 - 10^8), azaz érzékenyebb módszernek bizonyult, ami összhangban van az irodalmi adatokkal [LE BLAY et al. 2004]. Ennél a törzsnél a két detektálási módszerrel kapott eredmények megegyeztek egymással. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy a vizsgált tejsavbaktérium törzs koncentráció-függő módon tapadt, hiszen a hozzáadott baktériumok számának növelésével arányosan nőtt a megtapadó baktériumok száma is. Ez összhangban

van az irodalmi adatokkal [TUOMOLA (NÉE LEHTO) et SALMINEN 1998, FORESTIER et al. 2001]. A megtapadó baktériumok aránya 7% volt a 10^6 - 10^9 , 12.5 % a 10^5 és 139% a 10^4 baktérium/lyuk hozzáadott baktériumszám esetén a lemezöntéssel kapott eredményekből számolva. A csökkenő hozzáadott baktérium számmal a tapadó baktérium szám szórása is nőtt, mutatva a detektálás bizonytalanságát a kisebb koncentráció-tartományban.

Megállapítottam továbbá, hogy a megfelelő kiértékelhetőség érdekében minimum 10^6 - 10^7 baktérium/lyuk számban kell a tejsavbaktérium-törzset a Caco-2 sejtekhez adni a lemezöntéses detektálás, illetve 10^7 - 10^8 baktérium/lyuk számban mikroszkópos detektálás esetében. A további kísérletekben ezért – tekintettel arra, hogy mindkét detektálási módszert alkalmazni kívántam – a tejsavbaktériumokat 10^8 baktérium/lyuk számban adtam hozzá a sejtekhez. A vizsgált koncentráció tartományban nem alakult ki plató állapot, ami arra utalhat, hogy az alkalmazott legnagyobb koncentrációnál sem telítődtek a kötőhelyek a Caco-2 sejten. A tapadó baktériumok mikroszkópos képe (11. ábra) ugyanakkor azt mutatta, hogy a baktériumok egymásra rétegződtek, egymáshoz tapadtak és jelentős részük már nem érte el a Caco-2 sejtek felszínén lévő specifikus receptor molekulákat. Ebben a fázisban ezért jelentős szerepe lehet a baktérium törzs autoaggregációs képességének a tapadás mértékének alakulásában.

5.2.4. A *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* 2749 és az *Escherichia coli* Bay 100 törzsek versengő tapadásának vizsgálata

A kísérlet eredményeit a 17-21. táblázatok foglalják össze. A lemezöntéssel kapott értékek statisztikai értékelése során Poisson modellt alkalmaztam és ebből határoztam meg a standard hibát. A sejtszámlálás esetében magából a mintából számoltam ki a standard hibát és az egyedi illetve kevert tenyészetben tapadó baktériumok számát Mann-Whitney próbával hasonlítottam össze. A kísérletekből ellentmondásos eredmények születtek. A lemezöntéses eredményeket tekintve az első és a második kísérlet volt csak összhangban, azonban a harmadik ismétlés az előzőekkel ellentétes eredményt adott: az előbbi esetben mind az *E. coli*, mind a tejsavbaktérium kisebb számban tapadt kevert tenyészetben, mint egyedileg; a harmadik ismétlésben azonban a tapadás tendenciája megfordult.

17. táblázat: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* (Lb) és *E. coli* (Ec) egyedi és kevert tenyészetben mért tapadásának statisztikai vizsgálata. Tapadó baktériumok számának meghatározása lemezöntéssel. Zárójelben az a baktérium látható, amelynek jelenlétében a másik törzs sejtszámát megadtam kevert tenyészetek esetén. Az első vizsgálat eredményei.

| Kísérleti beállítás | Átlag (TKE/lyuk) | Átlagok közti különbség | p érték | 95%-os konfidencia intervallum | |
|--|--|-------------------------|---------|--------------------------------|----------------------|
| Ec 10 ⁸ Ec 10 ⁸ (+Lb) | 2,6x10 ⁴ 1,9x10 ³ | 2,41x10 ⁴ | <0,0001 | 1,70x10 ⁴ | 3,12x10 ⁴ |
| Ec 10 ⁷ Ec 10 ⁷ (+Lb) | 1,0x10 ³ 2,0x10 ² | 8,00x10 ² | 0,0006 | 3,57x10 ² | 1,24x10 ³ |
| Lb Lb (+Ec 10 ⁸) | 1,7x10 ⁷ 4,1x10 ⁶ | 1,29x10 ⁷ | <0,0001 | 1,11x10 ⁷ | 1,47x10 ⁷ |
| Lb Lb (+Ec 10 ⁷) | 1,7x10 ⁷ 3,0x10 ⁶ | 1,40x10 ⁷ | <0,0001 | 1,22x10 ⁷ | 1,58x10 ⁷ |

18. táblázat: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* (Lb) és *E. coli* (Ec) egyedi és kevert tenyészetben mért tapadásának statisztikai vizsgálata. Tapadó baktériumok számának meghatározása lemezöntéssel. Zárójelben az a baktérium látható, amelynek jelenlétében a másik törzs sejtszámát megadtam kevert tenyészetek esetén. A második vizsgálat eredményei.

| Kísérleti beállítás | Átlag (TKE/lyuk) | Átlagok közti különbség | p érték | 95%-os konfidencia intervallum | |
|--|--|-------------------------|---------|--------------------------------|----------------------|
| Ec 10 ⁸ Ec 10 ⁸ (+Lb) | 5,8x10 ⁶ 8,8x10 ⁵ | 4,92x10 ⁶ | <0,0001 | 4,58x10 ⁶ | 5,26x10 ⁶ |
| Ec 10 ⁷ Ec 10 ⁷ (+Lb) | 3,9x10 ⁴ 1,1x10 ⁴ | 2,80x10 ⁴ | <0,0001 | 2,68x10 ⁴ | 2,92x10 ⁴ |
| Lb Lb (+Ec 10 ⁸) | 1,8x10 ⁷ 1,3x10 ⁷ | 5,00x10 ⁶ | <0,0001 | 2,56x10 ⁶ | 7,44x10 ⁶ |
| Lb Lb (+Ec 10 ⁷) | 1,8x10 ⁷ 1,2x10 ⁷ | 6,00x10 ⁶ | <0,0001 | 3,58x10 ⁶ | 8,42x10 ⁶ |

19. táblázat: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* (Lb) és *E. coli* (Ec) egyedi és kevert tenyészetben mért tapadásának statisztikai vizsgálata. Tapadó baktériumok számának meghatározása lemezöntéssel. Zárójelben az a baktérium látható, amelynek jelenlétében a másik törzs sejtszámát megadtam kevert tenyészetek esetén. A 3. vizsgálat eredményei.

| Kísérleti beállítás | Átlag (TKE/lyuk) | Átlagok közti különbség | p érték | 95%-os konfidencia intervallum | |
|--|--|-------------------------|---------|--------------------------------|----------------------|
| Ec 10 ⁸ Ec 10 ⁸ (+Lb) | 5,8x10 ³ 2,9x10 ⁴ | 2,32x10 ⁴ | <0,0001 | 2,06x10 ⁴ | 2,58x10 ⁴ |
| Ec 10 ⁷ Ec 10 ⁷ (+Lb) | 1,6x10 ³ 3,9x10 ³ | 2,30x10 ³ | <0,0001 | 1,97x10 ³ | 2,63x10 ³ |
| Lb Lb (+Ec 10 ⁸) | 8,6x10 ⁵ 4,3x10 ⁶ | 3,44x10 ⁶ | <0,0001 | 3,01x10 ⁶ | 3,87x10 ⁶ |
| Lb Lb (+Ec 10 ⁷) | 8,6x10 ⁵ 2,2x10 ⁶ | 1,34x10 ⁶ | <0,0001 | 1,10x10 ⁶ | 1,58x10 ⁶ |

A sejtszámlálással kapott eredmények kevésbé voltak ellentmondásosak, mint a lemezöntéssel kapottak: az *E. coli* tapadásának mértéke nem tért el egyedi illetve kevert tenyészetben (kivéve a második ismétlésben 10⁸ TKE/lyuk hozzáadott csíraszám esetén, ahol több baktérium volt a kevert tenyészetben), a tejsavbaktérium tapadásának mértéke pedig mindkét ismétlésben nagyobb volt kevert tenyészetben. Bár az ismétlések eredményei nem voltak minden esetben összhangban, a kapott adatok alapján lehetett tenni néhány óvatos következtetést: a tejsavbaktérium jelenléte feltehetőleg nem befolyásolta az *E. coli* tapadásának mértékét, ugyanakkor a kórokozó sejtek egy része elpusztulhatott, illetve megsérülhetett (VBNC állapotba kerülhetett) a kevert tenyészetben, valószínűleg a tejsavbaktériumok anyagcsere termékei hatása miatt. A tejsavbaktérium tapadását ezzel szemben támogatta az *E. coli* jelenléte. Az élőcsíraszám ez esetben pedig csomósodás vagy a sejtpusztulás miatt csökkenhetett. Az előbbi feltételezéseknek ugyanakkor ellenmond, hogy a törzs koncentrációfüggő tapadásának vizsgálatakor nem tapasztaltam ilyen mértékű eltérést a két detektálási módszer között. Tekintettel a tapasztalt ellentmondásokra, a két baktérium kölcsönhatását Caco-2 sejteken tovább kell vizsgálni. Az egyértelműbb eredmények reményében ajánlatos más detektálási módszer(ek)e)t is alkalmazni. Továbbá, a nem tapadó baktériumok mosását többször (3-4-szer) ismételve ki kell zárni a gyengén (nem specifikusan) tapadó baktériumok jelenlétét.

20. táblázat: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* (Lb) és *E. coli* (Ec) egyedi és kevert tenyészetben mért tapadásának statisztikai vizsgálata. Tapadó baktériumok számának meghatározása mikroszkópos számlálással. Zárójelben az a baktérium látható, amelynek jelenlétében a másik törzs sejtszámát megadtam kevert tenyészetek esetén. 1. ismétlés eredményei. NS – nem szignifikáns

| Kísérleti beállítás | Baktériumszám/látótér | p érték |
|----------------------------|-----------------------|----------|
| Ec 10 ⁸ | 366,6 ± 70,0 | NS |
| Ec 10 ⁸ (+Lb) | 432,1 ± 55,7 | |
| Ec 10 ⁷ | 56,0 ± 10,7 | NS |
| Ec 10 ⁷ (+Lb) | 65,0 ± 20,3 | |
| Lb | 57,3 ± 12,8 | < 0,0001 |
| Lb (+Ec 10 ⁸) | 713,6 ± 125,4 | |
| Lb | 57,3 ± 12,8 | < 0,0001 |
| Lb (+ Ec 10 ⁷) | 802,6 ± 207,9 | |
| Lb (+ Ec 10 ⁷) | 802,6 ± 207,9 | NS |
| Lb (+Ec 10 ⁸) | 713,6 ± 125,4 | |

21. táblázat: *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* (Lb) és *E. coli* (Ec) egyedi és kevert tenyészetben mért tapadásának statisztikai vizsgálata. Tapadó baktériumok számának meghatározása mikroszkópos számlálással. Zárójelben az a baktérium látható, amelynek jelenlétében a másik törzs sejtszámát megadtam kevert tenyészetek esetén. 2. ismétlés eredményei. NS – nem szignifikáns

| Kísérleti beállítás | Baktériumszám/látótér | p érték |
|----------------------------|-----------------------|---------|
| Ec 10 ⁸ | 127,5 ± 18,5 | 0,0003 |
| Ec 10 ⁸ (+Lb) | 309,1 ± 43,0 | |
| Ec 10 ⁷ | 19,5 ± 3,06 | NS |
| Ec 10 ⁷ (+Lb) | 16,0 ± 1,73 | |
| Lb | 100,6 ± 22,2 | 0,002 |
| Lb (+Ec 10 ⁸) | 176,8 ± 21,3 | |
| Lb | 100,6 ± 22,2 | 0,001 |
| Lb (+ Ec 10 ⁷) | 232,6 ± 49,5 | |
| Lb (+ Ec 10 ⁷) | 232,6 ± 49,5 | NS |
| Lb (+Ec 10 ⁸) | 176,8 ± 21,3 | |

A tejsavbaktériumok többféle mechanizmussal csökkenthetik az enteropatogén baktériumokkal való fertőződés kockázatát: pl. olyan antagonista hatású anyagcsere termékek termelésével, amelyek csökkentik a kórokozók számát illetve virulenciáját; a mukóza felszínén lévő kötőhelyek elfoglalása vagy a gazda immunválaszának serkentése által [GÄNZLE et al. 1999]. Az irodalom számos tanulmányt közöl, amelyek *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek, valamint enterális kórokozó baktériumok in vitro kölcsönhatásának vizsgálatával foglalkozik epitheliális sejteken. GAGNON és munkatársai [2004] leírják, hogy – tenyésztéssel meghatározva a baktérium számot – három *Bifidobacterium* törzs 5-10,4%-kal csökkentette az *E. coli* tapadásának mértékét. Másrészt az *E. coli* mellett a bifidobaktériumok tapadása is csökkent. TODORIKI és munkatársai [2001] két *Lactobacillus* törzs antagonista hatását vizsgálva *Salmonella typhimurium*, *E. coli* és *Enterococcus faecalis* tapadására - és a tapadó baktériumokat tenyésztéssel detektálva – megállapították, hogy az előbbi két kórokozó esetében a tejsavbaktériumok csak kis mértékben (27-70%) csökkentik a tapadást, azonban az *E. faecalis* adhézióját az egyik *Lactobacillus* törzs 2-4 log egységgel is képes volt csökkenteni. A további vizsgálat kiderítette, hogy a jelentős mértékű gátlásért a tejsavbaktérium által termelt antimikrobiális vegyület volt a felelős, azaz ebben az esetben a receptorért folyó versengésnek illetve a patogének megkötődése térbeli akadályozásának nincs jelentős szerepe. Ez összhangban van az általam tapasztaltakkal is. DRAGO és munkatársai [1997] szintén azt találták, hogy újszülöttek bélsarából izolált, potenciálisan probiotikus *Lactobacillus*-ok hatékonyan gátolták *S. enteritidis* és *E. coli* szaporodását kevert tenyészetben és a gátlást anyagcsere termékek okozták. A szerzők továbbá koaggregációt figyeltek meg a *Lactobacillus*-ok és a patogének között, ami a hozzájárulhatott a tejsavbaktériumok antibakteriális anyagcsere termékeinek hatékony működéséhez, hiszen azok közvetlenül átadódhattak a velük összekapcsolódó kórokozóknak. A koaggregáció azonban nem csak az antibakteriális vegyületek átadása szempontjából fontos. A baktériumok összekapcsolódása ugyanis elfedheti azokat az adhéziós molekulákat, amelyekkel az epitheliális receptorokhoz tudnának kötődni. Ez is egy, a kórokozók megtapadását akadályozó mechanizmus, amellyel a tejsavbaktériumok hozzájárulhatnak a szervezet védekezéséhez [SPENCER et CHESSON 1994]. A koaggregáció jelentőségét hangsúlyozták JIN és munkatársai [1998] is, akik *E. coli*-val nem aggregálódó *Lactobacillus* törzseket vizsgáltak és nem tapasztaltak tapadás gátló hatást a kórokozóval szemben. Kísérleteim során nem vizsgáltam a tejsavbaktérium törzs és az *E. coli* koaggregációját. Azonban ha volt is koaggregáció a baktériumok között, annak nem volt hatása az *E. coli* tapadásának mértékére.

5.3. Versengő szaporodás vizsgálata folyékony tápközegekben

5.3.1. *Bacillus cereus* T vegetatív sejtjei nizin érzékenységének vizsgálata

A vizsgálat eredményét a 22. táblázatban tüntettem fel. A nizin mennyiségét μg mellett nemzetközi egységben (IU) is megadtam. Az adatok alapján megállapítható, hogy a *B. cereus* T törzs érzékeny volt a nizin bakteriocinre, mivel a lyukak körül feltisztulási zónák alakultak ki az agarba diffundáló nizin oldat hatására. A feltisztulási zónák mérete a hozzáadott nizin mennyiségének csökkenésével csökkent, a 6,25 μg nizin már gyakorlatilag hatástalan volt.

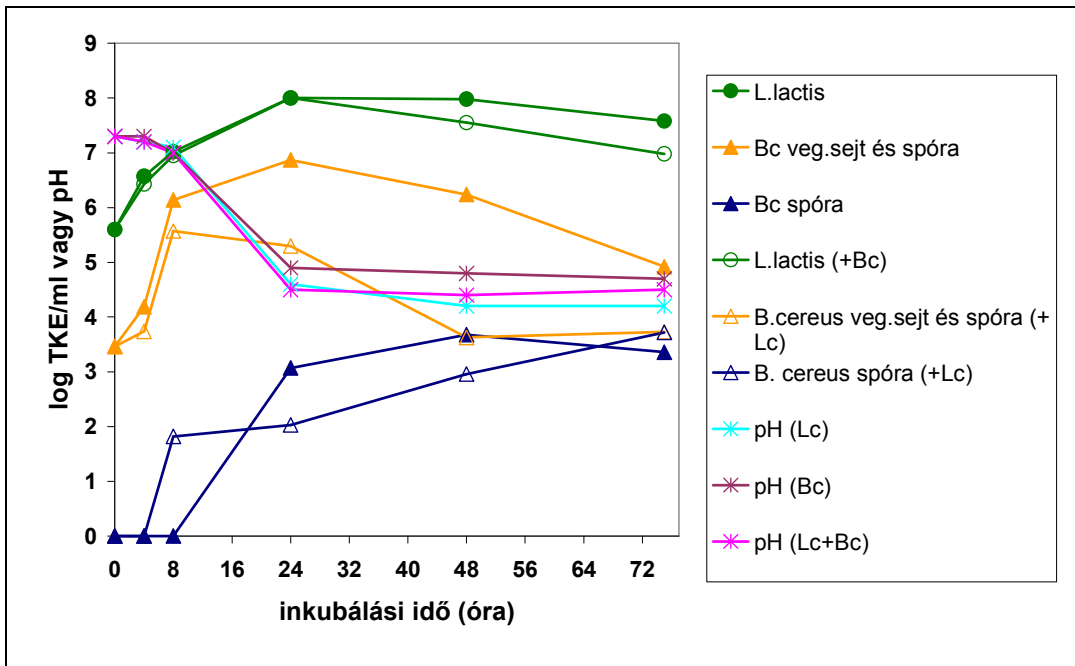
22. táblázat: *B. cereus* T vegetatív sejtjeinek gátlása nizzinnel. Az agarba kevert tesztmikroba koncentrációja kb. 10^7 TKE/ml.

| Nizin mennyisége a lyukban μg (IU) | Gátlási zóna átmérője (mm) | |
|--|----------------------------|------|
| 50 (2000) | 13,5 | 12,5 |
| 25 (1000) | 11 | 10 |
| 12,5 (500) | 9 | 8,5 |
| 6,25 (250) | 7 | 6 |

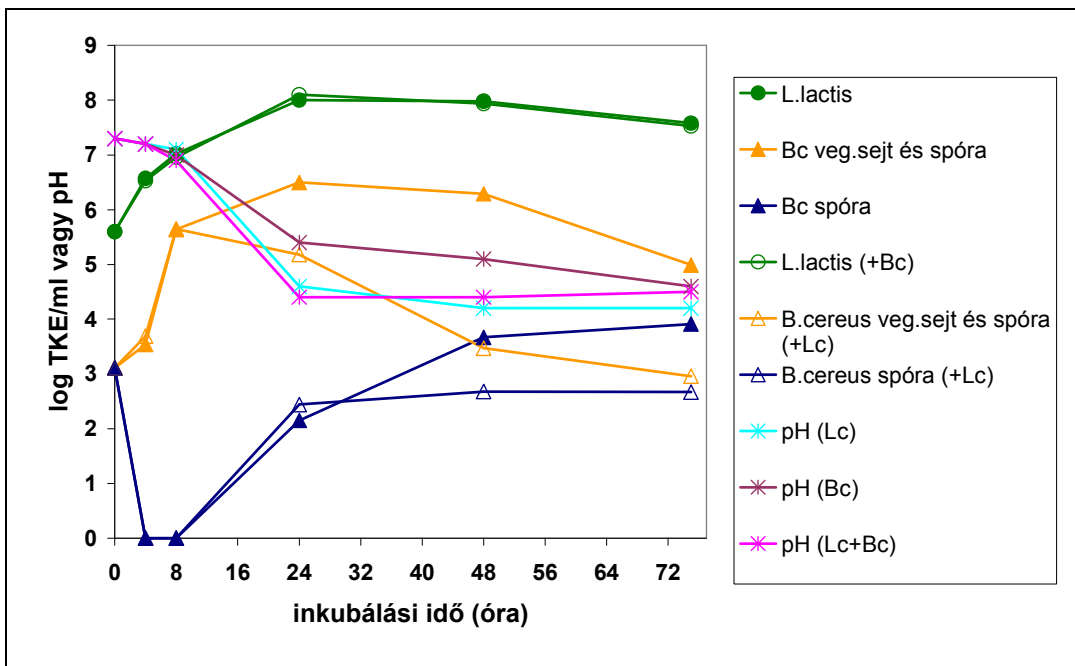
Az irodalom úgy tartja számon a nizint, mint a Gram-pozitív baktériumfajok széles spektruma ellen hatásos bakteriocint, amely a vegetatív sejtek elpusztítása mellett a spórák kihajtását is képes gátolni [DELVES-BROUGHTON 1990]. Az érzékeny baktériumok azonban védekezéséppen rezisztenciát alakíthatnak ki a nizin ellen. A rezisztencia oka lehet, hogy a baktériumok nem képesek többé megkötni a bakteriocint a felszínükön, vagy enzimes módosítással teszik hatástalanná a molekulát. *B. cereus* esetében például kimutatták, hogy a baktérium a dehidroalanin reduktáz enzimmel képes inaktiválni a nizin molekulát [JARVIS et FARR 1971].

5.3.2. *Lactococcus lactis subsp. lactis* 1881 és *Bacillus cereus* T versengő szaporodása PCB-ben

Az eredményeket a 12-13. ábrák mutatják. A grafikonokról leolvasható, hogy mindkét baktérium beoltás után gyorsan elszaporodott a tápközegben, ami a tejsavbaktérium esetében log 2-3, a *B. cereus* esetében log 3-4 egységgel való csíraszám növekedést jelentett az egyedi tenyészetekben. A *B. cereus* spórák beoltás után azonnal kicsíráztak és elszaporodtak, és a továbbiakban a vegetatív formában beoltott baktériumokhoz hasonló csíraszámot érték el.



12. ábra.: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1881 és *Bacillus cereus* T versengő szaporodása PCB-ben. *B. cereus* beoltása vegetatív sejtékként, az inkubálás 30°C-on történt. n=2



13. ábra.: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1881 és *Bacillus cereus* T versengő szaporodása PCB-ben. *B. cereus* beoltása spóráként, az inkubálás 30°C-on történt. n=2

A maximális csíraszámot mindkét mikroorganizmus esetében a 24 órás kioltáskor mértem, ez a tejsavbaktériumnál 1×10^8 , a *B. cereus*-nál pedig 7×10^6 (beoltás vegetatív sejtékként) illetve 3×10^6 (beoltás spóráként) TKE/ml volt. A csíraszám növekedéssel fordítottan arányos mértékben csökkent a pH a savtermelés következtében. A legnagyobb pH csökkenés, érthető módon, a beoltás utáni 8-24 óra között volt megfigyelhető, amikor a baktériumok szaporodása

logaritmusos fázisban volt. A pH-csökkenés, a disszociálatlan savak jelenléte, valamint a tápanyagok kimerülése miatt kialakuló kedvezőtlen körülmények hatására a *B. cereus* vegetatív sejtek spórázni kezdtek, egy részük pedig elpusztult. Három nap elteltével a populációban már 10^3 - 10^4 TKE/ml spóra volt jelen. Kevert tenyészetben vizsgálva a mikrobák csíraszámát, látható, hogy a tejsavbaktérium szaporodását nem befolyásolta jelentősen a *B. cereus* jelenléte, ami elsősorban annak köszönhető, hogy 1000-szer nagyobb kiindulási koncentrációban oltottam be a táptalajba. Ezzel szemben a *B. cereus* szaporodását gátolta a *Lc. lactis* jelenléte: a legnagyobb csíraszámot a beoltás után 8 órával mértem, és csupán 2 nagyságrendnyi növekedést tapasztaltam a beoltáshoz képest. A baktériumok egy része ($6,6 \times 10^1$ TKE/ml) már ekkor spóra állapotban volt, 75 órával a beoltás után pedig a *B. cereus* sejtek szinte kizárólag spóráként voltak jelen. Hasonló folyamatok játszódtak le a *B. cereus* spórával beoltott kevert tenyészetben is, bár a spóráképzés itt csak később kezdődött el. A tejsavbaktérium baktericid hatása tehát érvényesült a *B. cereus* vegetatív sejtjein, azonban teljes elimináció nem következett be, mivel a sejtek spóra állapotba „menekültek” a kedvezőtlen körülmények között. A savas pH szaporodás gátló hatását támasztják alá BENEDICT és munkatársai [1993] eredményei, akik *B. cereus* növekedési kinetikáját vizsgálva azt találták, hogy a pH-t 4,75-ről 5,00-re állítva, a lag szakasz 20,04 órától 2,26 órára csökken. Bár a *B. cereus* képes szaporodni a 4,3-9,0 pH tartományon belül [LUND 1990], a minimális pH, amit a baktérium még tolerálni tud, törzsről törzsre változik, valamint függ a sav tulajdonságaitól is. VALERO és munkatársai [2000] vizsgálataiban ugyanakkor a pH 4,75 volt a legkisebb pH érték, amin a *B. cereus* törzsek még szaporodni tudtak sárgarépa szubsztráton. Kísérletemben a *Lc. lactis* savtermelése hatására a pH 4,4-4,5-re csökkent, ami akár önmagában elegendő lehet az antimikrobás hatás kialakításához. Ez a pH érték azonban csak lassan – a tejsavbaktérium elszaporodásával párhuzamosan – alakult ki, ezért a szaporodásgátló hatás is késleltetett volt. Más a helyzet, amikor a kórokozó a beoltás után néhány órával később kerül a termékbe, amikor a tejsavbaktériumok tevékenysége már kialakította a savas környezetet. Ezért van nagy jelentősége annak, hogy inokulálásakor az aszeptikus körülmények biztosítva legyenek.

A *Lc. lactis* anyagcseréje során nagy mennyiségű szerves sav, elsősorban tejsav képződik, a *B. cereus* szaporodásának gátlásában ezért jelentős szerepe van a savhatásnak is. A képződő gyenge sav disszociálatlan, apoláros molekulái könnyen átjutnak a plazmamembránon, majd a citoplazmában disszociálódnak. A felszabaduló protonok csökkentik a sejten belül a pH-t és ezáltal gyengítik, végső esetben megszüntetik a transzmembrán protongrádienszt. A proton mozgatóerő megszűnése végzetes a sejtre nézve, hiszen ez működteti pl. az ATP-bioszintézist vagy a különböző transzport folyamatokat. Az egyes gyenge savak antimikrobás hatása eltérő,

ami disszociációs állandójukkal függ össze. A tejsav ebből a szempontból hatékonyabb, mint a citromsav, azonban az ecetsavnál gyengébb [DEÁK 2006].

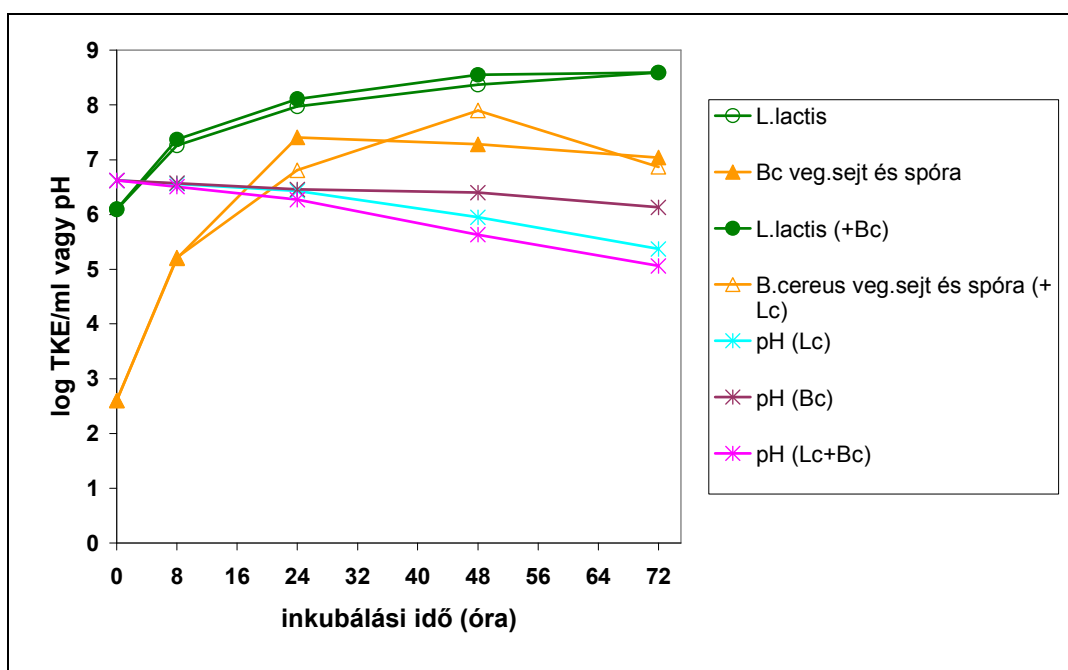
Az antimikrobás hatású anyagcseretermékek termelése mellett a tejsavbaktériumok a tápanyagokért is versengenek a fermentáció során. Kísérleteimben a tejsavbaktériumok már a beoltáskor 2-3 log egységgel nagyobb koncentrációban voltak jelen, mint a kórokozó, ezért képesek voltak túlnőni a kórokozót annak ellenére, hogy a *Lc. lactis* generációs ideje hosszabb, mint *B. cereus*-é. A beoltási csíraszámok ilyen mértékű eltérése a tejsavbaktérium javára reális helyzetet modellez, hiszen a *B. cereus* csíraszám 10²-10³ TKE/ml a nyers termékekben, ugyanakkor a tejtermékek beoltása kb. 10⁶-10⁷ TKE/ml starter kultúrával történik. Mivel a baktérium spórái nem pusztulnak el pasztörözés során, ezért a *B. cereus* előfordulására pasztörözött tejben is számítani kell.

A tejsavbaktérium jelenlétében a *B. cereus* a beoltástól számított 8 óra elteltével stacioner fázisba került, míg egyedi tenyészetben ez csak 24 óra elteltével következett be. A stacioner fázis korai indukcióját vegyes tenyészetek esetében más szerzők is leírják [FARKAS et al. 2002, BUCHANAN et BAGI 1997]. A szerzők szerint a jelenség tipikus válaszreakció versengő mikroba tenyészetekben és magyarázata a maximális populáció denzitás (MPD) növekedésgátló hatásában keresendő. A megfigyelések szerint, amikor a gyorsabban szaporodó kompetitor eléri a maximális csíraszámát, a másik organizmus szaporodása is abbamarad. A folyamatot feltehetőleg szignál molekulák (az ún. quorum sensing jelenség) irányítják a „zsúfoltság” elkerülése érdekében. Kísérletemben a gyorsabban szaporodó kompetitor, a *Lc. lactis* a beoltás után 8 órával még nem érte el a rá jellemző MPD értéket, ezért a *B. cereus* korai stacionáris fázisba kerülésében ennek feltehetően nincs, vagy kisebb szerepe.

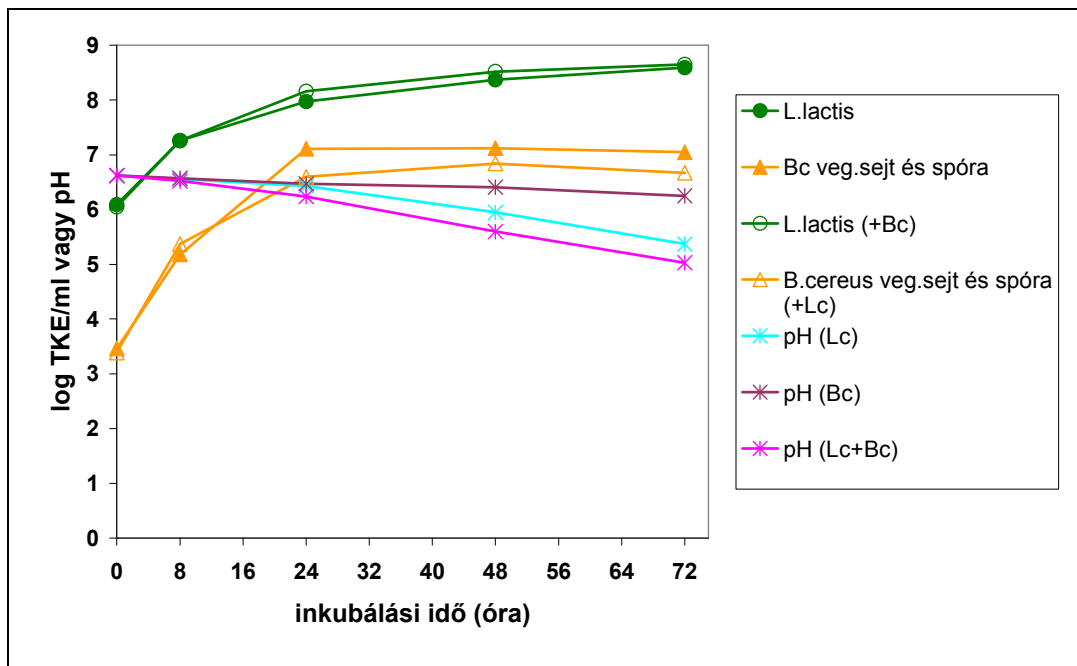
Az antimikrobiális hatások között számításba kell venni a bakteriocin hatást is, hiszen a *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCM1881 számú törzs törzsgyűjteményi adatai szerint termel nizin. (Ez a törzs egyébként identikus az ATCC 11454 törzssel, amely számos nizzinnel kapcsolatos vizsgálat tesztorganizmusa, pl. [MILLETTE et al. 2004, YUKSEL et HANSEN 2007].) Mivel a kísérlet során nem történt nizin-meghatározás, ezért a nizin jelenlétét nem lehet biztosra venni. Ismert ugyanis, hogy a tejsavbaktériumok bakteriocin termelését a törzsön kívül alapvetően meghatározza a tenyésztőközeg összetétele is: a szén-, a nitrogén- és a foszfátforrás, a kationok, a felületaktív anyagok és az inhibitorok. Emellett befolyással vannak rá a fermentáció körülményei is: a pH (az optimális általában a pH 5,5-6,0), a hőmérséklet (a baktérium az optimális növekedési hőmérsékletén termeli a legtöbb bakteriocint) vagy a levegőztetés hatása [PARENTE et RICCIARDI 1999]. Emiatt a nizin termelés képességét hordozó baktérium nem feltétlenül termel nizin.

5.3.3. *Lactococcus lactis subsp. lactis* 1881 és *Bacillus cereus* T versengő szaporodása tejben

A kísérlet eredményeit a 14-15. ábra mutatja. Hasonlóképpen a PCB táptalajhoz, a beoltott baktériumok gyors szaporodásnak indultak a tejben is, és 24 órán belül log 2 (*Lc. lactis*) illetve log 4 (*B. cereus*) csíraszám növekedést értek el egyedi tenyészetben. A tej pH-ja - ellentétben a tápközegben mérttel, - nem drasztikus, hanem fokozatos csökkenést mutatott mindkét egyedi tenyészet esetében. A minimális pH érték a vizsgált időszak végéig sem csökkent pH 5 alá (*Lc. lactis* pH 5,4, *B. cereus* pH 6,1 illetve 6,3), amit a tej jó pufferoló képessége magyaráz. Kevert tenyészetben a baktériumok csíraszámváltozásai hasonló módon alakultak az egyedi tenyészetben mértékhez, ami arra utal, hogy egyik baktérium sem zavarta a másik szaporodását jelentős mértékben. A pH alakulását a tejsavbaktérium savtermelése határozta meg.



14. ábra.: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1881 és *Bacillus cereus* T versengő szaporodása 0,1% zsírtartalmú UHT tejben. *B. cereus* beoltása vegetatív sejt-ként, az inkubálás 30°C-on történt. n=2



15. ábra.: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1881 és *Bacillus cereus* T versengő szaporodása 0,1% zsírtartalmú UHT tejben. *B. cereus* beoltása spóraként, az inkubálás 30°C-on történt. n=2

Eltérően a *Lc. lactis* PCB tápközegben megfigyelt bakteriosztatikus hatásától, a *B. cereus*-ra nem hatott jelentős gátló hatás tejben. Ennek leginkább a tej pufferoló képessége lehet az oka (a pH 3 nap elteltével is csupán 5,1 illetve 5,0 a kevert tenyészetben). Emellett a koagulálódó tej kazeinmicellái közé bezáródó baktériumok térben jobban elválasztódhattak egymástól, és így a *B. cereus* sejtek egy védettebb mikrokörnyezetben tudtak szaporodni, védve a tejsavbaktériumok antimikrobás anyagcseretermékeitől. Tekintettel arra, hogy a tej a táptalajnál tápanyagokban gazdagabb szaporító közeg, amely lassabban merül ki, a tápanyagokért folyó versengésnek sem lehetett jelentős hatása.

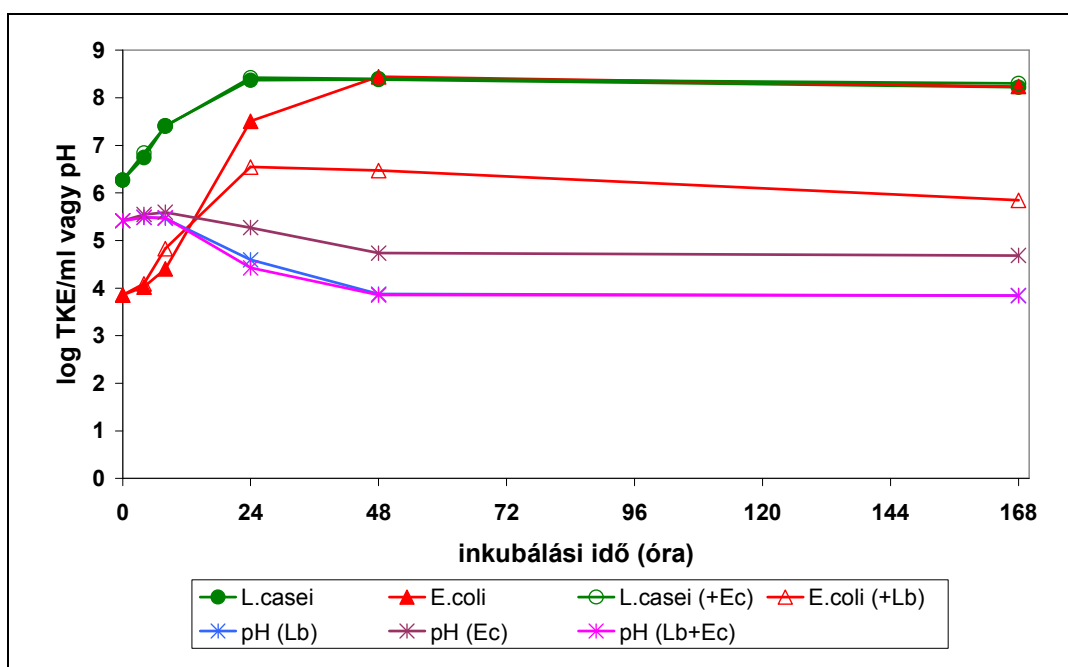
Az irodalomban már régóta ismert, hogy a táptalajban végzett kísérletek eredményei nem extrapolálhatók egy az egyben az élelmiszerekre, hiszen az élelmiszerek nagyon összetett, többkomponensű rendszerek, amelyek általában több, egymással kapcsolatban lévő mikrokörnyezetből állnak. Különösen igaz ez a bakteriocinek hatásaira. Az élelmiszerekben uralkodó körülmények, vagy az élelmiszerek összetevői és a bakteriocinek között létrejövő számos kölcsönhatás ugyanis jelentős mértékben gátolhatja a bakteriocinek hatását. Nizin esetében például, problémát okoz a molekula apoláros jellege. JONES [1974] vizsgálataiban a nizin sokkal hatékonyabban gátolta a *Staphylococcus aureus*-t zsírmentes tejben, mint teljes tejben, a szerző a hatást a tej zsírtartalmának tulajdonította. JUNG és munkatársai [1992] növekvő zsírtartalom (0-12,9%) hatását vizsgálták tejben és megállapították, hogy ahogy nőtt a zsír koncentrációja, úgy csökkent a nizin antibakteriális hatása a *Pediococcus pentosaceus*

érzékeny tesztorganizmussal szemben. 12,9% zsírtartalmú tejben a csökkenés 88%-os volt a desztillált vízben oldott nizinhez képest (50 IU/ml, pH 2). A nizin molekula lipidoldékony jellege szükséges a célmikrobák membránjába való beépüléshez, azonban emiatt jól kötődik az élelmiszerben található zsírszemcsékhez is, amelyek így inaktíválják a lipofil nizin molekulákat. Ennek ellenére a nizin hagyományosan jól használható pl. sajtok klosztrídiumos romlásának késleltetésére, illetve megelőzésére [DELVES-BROUGHTON, 1990]. Hasonlóképpen gátolható volt pl. a *L. monocytogenes* növekedése is a *Lc. lactis* ATCC 11454 nizin termelő törzssel nyers tejben [RODRÍGUEZ et al. 1997]. A nizin hatékonyságát ugyanakkor tovább lehet növelni, amennyiben a tejet emulgeálószerrel, Tween 80-nal egészítik ki. A Tween 80 képes elmozdítani a fehérjéket a zsírszemcséről, ezzel megakadályozni az inaktíválódásukat [JUNG et al. 1992]. Hasonlóképpen a Tween 80 hatásosnak bizonyult a pediocin AcH stabilizálásában is *Listeria monocytogenes* gátlása során tejszínben [DEGNAN et al. 1993]. Mivel azonban az élelmiszer előállítás során nem használható fel a Tween 80, ezért a nizin védelmét – az élelmiszeriparban ízesítő illetve emulgeáló szerként használt – monogliceridek (pl. monolaurin [MANSOUR et MILLIÈRE 2001]) hozzáadásával vagy liposzómákba csomagolásával [DEGNAN et al. 1993, BENECH et al. 2002] lehet megoldani. JUNG és munkatársai [1992] a desztillált vízben oldott nizinhez képest csökkent hatékonyságot tapasztaltak zsírmentes tejben is (33%-os csökkenés), azaz a nizin nem csak a tej zsírszemcséihez, hanem más komponenseihez (fehérjékhez) való kötődés is képes inaktíválni. Ennek ellenére az irodalomban leggyakrabban zsírmentes tejet (skimmed milk) használnak a nizin antibakteriális hatásának tesztelésére egyedi vagy kombinált kezelések során. Vizsgálataimban ezért én is zsírmentes (0,1% zsírtartalmú) tejet használtam, ugyanakkor mégsem tapasztaltam a *B. cereus* szám csökkenését az egyedi tenyészetekhez képest. Mivel előzetes tesztben már igazoltam a *B. cereus* T törzs érzékenységét nizinre, ezért ezekből az eredményekből arra következtetek, hogy a CCM 1881 számú törzs feltehetően elvesztette a bakteriocin termelő képességét illetve valamilyen más okból nem termelt – elegendő – nizin a *B. cereus* gátlására.

5.3.4. *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* 2749 és *Escherichia coli* Bay100 versengő szaporodása csicsókalében

A kísérlet eredményét a 16. ábra mutatja. A grafikonokról leolvasható, hogy a csicsókalé mindkét baktérium számára megfelelő tápközegnek bizonyult. A tejsavbaktérium 24 órán belül elérte a maximális csíraszámát, $8,4 \times 10^8$ -t, ami kb. 2 log növekedést jelent a beoltási koncentrációhoz képest. Az *E. coli* száma 24 óra alatt több mint 3 log egységgel növekedett

meg, majd további 24 óra elteltével még 1 log egységnyi növekedést ért el, így a maximális csíraszám csicsókalében szintén $8,4 \times 10^8$ volt. Az *E. coli* lassabb szaporodását elsősorban a szuboptimális növekedési hőmérséklet (25°C) okozhatta, hiszen enterális baktérium lévén a számára optimális szaporodási hőmérséklet 37°C körüli. Bár a csicsókalé kiindulási pH-ja gyengén savas (pH 5,4), a baktériumok anyagcseréje további pH csökkenést eredményezett. A *Lb. casei* esetében a pH 3,87-ig csökkent. Figyelemre méltó, hogy bár a maximális csíraszámot a tejsavbaktérium a beoltás után 24 órával elérte és utána nem nőtt tovább, a pH tovább csökkent és a minimális értéket csak 48 óra eltelével érte el. Ez arra utal, hogy bár a baktérium populáció szaporodása leállt (vagyis az osztódás és pusztulás mértéke egyensúlyba került), a baktériumok anyagcseréje tovább folytatódott. A plató állapot tehát nem a tápanyagok kimerülése miatt állt be.



16. ábra: *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 és *Escherichia coli* Bay100 versengő szaporodása csicsókalében. Az inkubálás 48 óráig 25°C -on, 48-168 óráig 12°C -on történt. $n=2$

Az *E. coli* szaporodása során szintén csökkent a tápközeg pH-ja, de kisebb mértékben, mint a *Lb. casei* esetében: a végső pH 4,7-re állt be. Kevert tenyészetben a tejsavbaktérium az egyedi tenyészetrel azonos szaporodást mutatott, ami arra utal, hogy a kórokozó jelenléte nem befolyásolta a szaporodását. A pH változás mértékét a tejsavbaktérium határozta meg (végső pH 3,84). Az *E. coli* szaporodása gátlódott a tejsavbaktérium jelenlétében és az egyedi tenyészethez képest 2 log egységgel kisebb volt a végső csíraszám. A kísérlet végéig már nem volt jelentős változás a 48 óra elteltével mért csíraszámokhoz képest, hűtőhőmérsékleten

(12°C) mintegy „konzerválódott” az addig kialakult állapot. Tejsavbaktériumok jelenlétében az *E. coli* szaporodásának gátlását más szerzők is megfigyelték [MAREK et al. 2004, MUFANDAEDZA et al. 2006], sőt a részletes vizsgálatok arra is fényt derítettek, hogy a gátlásért szinte kizárólag a szerves savak (elsősorban a tejsav és az ecetsav) felelősek. Ahogy a 3.4.1. fejezetben leírtam az antimikrobás hatást legnagyobb részben a szerves savak disszociálatlan molekulái okozzák, amelyek – lipofil vegyületek lévén – könnyen átjutnak a plazmamembránon, majd a citoplazmában disszociálódnak. A képződő anionok gátolják a baktériumok anyagcseréjét, a felszabaduló protonok pedig lecsökkentik a pH-t és ezáltal gyengítik a transzmembrán protongrádiensét. OGAWA és munkatársai [2001] megállapították, hogy a tejsav disszociálatlan molekuláinak a szaporodás leállítása mellett citotoxikus hatása is van. Vizsgálataik szerint a tejsav 3,2 - 62 mM koncentrációban bakteriosztatikus hatású az *E. coli* O157:H7 törzsére, míg 62 mM-nál nagyobb koncentrációban már baktericid hatása van. Az *E. coli* szaporodásának visszaszorításában vegyes tenyészet esetén az előbbieket mellett szerepe lehetett az 5.3.2. fejezetben leírt maximális populáció denzitás (MPD) növekedésgátló hatásának, a tápanyagokért folytatott versengésnek, valamint egyes bakteriocinek jelenlétének is. A bakteriocinek normál körülmények között hatástalanok a Gram-negatív baktériumokkal szemben – mivel nem képesek átjutni a baktériumok külső membránjára – azonban egyes mechanikai hatások (pl. fagyasztás, hőkezelés) vagy a membrán áteresztőképességét megváltoztató vegyületek (ún. permeabilizátorok, pl. EDTA, polimixin-B) hatására a külső membrán destabilizálódik és érzékennyé válik a bakteriocinek támadásával szemben [BELFIORE et al. 2007]. ALAKOMI és munkatársainak [2000] eredményei szerint a tejsav szintén hatékony permeabilizátor, ugyanis hatására kioldódnak a külső membránból a lipopoliszacharid (LPS) molekulák, amelyek alapvető fontosságúak a membrán permeabilis gát funkciójának megteremtésében. A *Lb. casei* által esetlegesen termelt bakteriocin tehát hatásos lehetett a kevert tenyészetekben, amelyekben a jelentős pH csökkenés nagy mennyiségű sav (főként tejsav) termelődésére utal. Mivel azonban nem következett be az *E. coli* teljes eliminációja, a tejsav koncentrációja valószínűleg nem érte el a megfelelő szintet. A teljes elimináció elmaradását ugyanakkor magyarázhatja az is, hogy a kórokozóban tolerancia alakult ki a kis pH-val szemben, amint arról több szerző is beszámol az *E. coli* és más Gram-negatív baktériumok esetében [BAIK et al. 1996, PARK et al. 1996, RYU et al. 1999].

A 23. táblázatban összefoglaltam a folyadék tápközegekben végzett kísérletek paramétereit és a tejsavbaktériumok jelenlétében a romlás/kórokozó baktériumok szaporodására ható gátlás mértékét az egyedi tenyészetekhez képest. A gátlás százalékát a következőképpen számoltam ki: $1-A/B \times 100$, ahol A = a romlás/kórokozó baktérium végső csíraszama (TKE/ml) egyedi tenyészetben, B = a romlás/kórokozó baktérium csíraszama (TKE/ml) a tejsavbaktérium

jelenlétében [PITT et al. 2000 nyomán]. Az eredmények azt mutatják, hogy a legjelentősebb gátlás (99,6%) az *E. coli* szaporodásában következett be csicsókalében, míg legkevésbé (38,3%) a *B. cereus* vegetatív sejtjeit volt képes gátolni a tejsavbaktérium a tejben. Az eredmények magyarázatára az egyes kísérleteknél tértem ki.

23. táblázat: A folyadék tápközegekben végzett kísérletek paraméterei és a tejsavbaktériumok által okozott gátlás mértéke.

| Tejsavbaktérium | Kórokozó | Tápközeg | Hőmérséklet | Gátlás (%) | Végző pH |
|--|---------------------------------|------------|-------------|------------|----------|
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>B. cereus</i> vegetatív sejt | PCB | 30°C | 93,5% | 4,5 |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>B. cereus</i> spóra | PCB | 30°C | 99,1% | 4,5 |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>B. cereus</i> vegetatív sejt | Tej | 30°C | 38,3% | 5.5 |
| <i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> | <i>E. coli</i> | Csicsókalé | 25°C | 99,6% | 3,9 |

5.4. Új tudományos eredmények

1. Meghatároztam 3 baktériumtörzs (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *P. fluorescens* III P 13a, *L. monocytogenes* LM6) függőleges fém felülethez való tapadóképességét és megállapítottam, hogy jelentősen eltér (0,1-10%). A fém felülethez való tapadást befolyásolta annak helyzete, függőleges felületre a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tapadása kisebb volt, mint vízszintesre.
2. Vegyes tenyészetben vízszintes fém felülethez való tapadás esetén megállapítottam, hogy a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* elősegítette a vizsgált romlást-okozó illetve kórokozó törzs kitapadását.
3. Élő szövethez való kitapadást vizsgálva megállapítottam, hogy a *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 törzs az *E. coli* Bay100 törzs megtapadását nem, vagy nem lényegesen akadályozta, de a kitapadt sejtekre baktericid hatást fejtett ki.
4. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a tapadás-vizsgálatokra általánosan elterjedt módszerek nem elég érzékenyek egzakt, kvantitatív összehasonlításokhoz. A valós helyzet jobb megismerése érdekében párhuzamosan több kimutatási módszer alkalmazása adhat csak reális képet.
5. Folyékony tápközegben a *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCM1881 gátló hatást fejtett ki *B. cereus* T vegetatív sejtekre, azonban nem akadályozta a spóra kicsírázását, illetve a spóraképzést. Gazdagabb tápközegben (tej) a gátló hatás mérsékeltebb volt.
6. Az *E. coli* Bay100 jól gátolható volt *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 törzsszel csicsókalében, a gátlás változatlan mértékben fennmaradt hűtőszekrény hőmérsékleten.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

- Vizsgálataim során függőleges és vízszintes helyzetű rozsdamentes acél felületen tanulmányoztam a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Pseudomonas fluorescens* és a *Listeria monocytogenes* tapadását (a biofilm képződés első fázisa), és megállapítottam, hogy a tejsavbaktériumok esetében a tapadás mértékét befolyásolta a vizsgált felület helyzete: függőleges felület esetében a tapadás vizsgálata nehezebb volt, és ritkán adott reprodukálható eredményeket. A jelenség oka valószínűleg az lehetett, hogy a nagy méretű, nem motilis *Lactobacillus* sejtek kiüledtek a szuszpenzióból. A természetben mind függőleges, mind vízszintes felületeken előfordul biofilm képződés. Ebből adódóan – tekintettel a megfigyeléseimre – javasolt, hogy biofilmek tanulmányozására beállított modell-rendszerekben mind a függőleges, mind a vízszintes felületek bakteriális kolonizációja vizsgálat alá kerüljön, így a biofilmképződésről átfogóbb képet lehet alkotni.
- Rozsdamentes acélhoz történő versengő tapadás esetén megállapítottam, hogy a vizsgált tejsavbaktérium törzs nem gátolta, hanem ellenkezőleg, elősegítette a *P. fluorescens* és a *L. monocytogenes* adhézióját az által, hogy tapadási felületet kínált számukra. A kísérletben alkalmazott, tápanyag-mentes környezetben a tejsavbaktériumok nem tudtak növekedni és ezért antimikrobiális anyagokat sem termeltek, amelyek visszaszoríthatnák volna a káros mikrobákat. Tápanyagszegény körülmények – legalábbis átmenetileg – gyakorta előfordulnak az élelmiszeripari felületeken, emiatt a gazdag tápanyag-ellátottságot igénylő tejsavbaktériumok hátrányba kerülhetnek, és nem képesek betölteni szerepüket a biológiai védekezésben. Ebből adódóan javasolt – a tápanyagokban gazdagabb környezethez alkalmazkodott törzsek helyett – az adott üzemek felületeiről, az ott uralkodó körülményekhez már alkalmazkodott törzseket izolálni és ezek közül kiválasztani a potenciális biokontroll szervezeteket.
- Három baktériumtörzs bélhámsejtekhez való tapadásának vizsgálata során megállapítottam, hogy a tapadó baktériumok kimutatására alkalmazott módszerek (tenyésztéses és mikroszkópos vizsgálat) – kisebb-nagyobb mértékben – eltérő eredményeket adtak. Az eltérés hátterében jelen esetben a baktériumok aggregátum-képző hajlama állhatott. A valós helyzet jobb megismerése érdekében ezért

párhuzamosan több kimutatási módszer alkalmazása javasolt. Célszerű lenne olyan módszer(ek) kidolgozása is, amely(ek) in situ vizsgálatokat tesz(nek) lehetővé az élelmiszeripari üzemekben.

- Folyékony tápközegben *Lc. lactis* subsp. *lactis* és *B. cereus* T versengő szaporodásának vizsgálata során megállapítottam, hogy a tejsavbaktérium gátló hatást fejtett ki a kórokozó vegetatív sejtjeire, azonban nem akadályozta a spóra kicsírázását, illetve a spóraképzést. A tejsavbaktérium elszaporodásával kialakuló kedvezőtlen körülmények hatására a *B. cereus* spóra állapotba “vonult vissza”, és ezáltal nem következett be a kórokozó teljes eliminációja. *B. cereus* jelentős problémákat okozhat a tejiparban, mivel a pasztörözés nem pusztítja el a spórákat, amelyek kedvező körülmények közé kerülve gyorsan kicsíráznak és elszaporodnak a tejben. Eredményeim ugyanakkor arra engednek következtetni, hogy a tejsavas fermentáció során képződő anyagcsere-termékek fenntartják a kedvezőtlen körülményeket, amelyek között a spórák nem képesek kicsírázni. Ebből a szempontból jelentős szerepe van annak, hogy a fermentáció minél gyorsabban végbemenjen a nyersanyagban.
- Folyékony tápközegben *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* és *E. coli* Bay100 törzsek versengő szaporodásának vizsgálata alapján megállapítottam, hogy a tejsavbaktérium, bár hatékonyan gátolta a kórokozót, nem okozott teljes eliminációt az *E. coli* populációban a vizsgált időtartamon belül. A gátlás mértéke később változatlan formában maradt fenn hűtőszekrény hőmérsékleten. Ezek az eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy a tejsavbaktériumok alkalmazása önmagában nem jelent teljes biztonságot e kórokozókkal szemben. A kockázat csökkentése érdekében továbbra is fontos szerepe van a higiéniai szabályok szigorú betartásának és az alapanyag pasztörözésének.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Előzmények, célkitűzések

A tejsavbaktériumokkal erjesztett élelmiszerek alapvető szerepet töltenek be táplálkozásunkban, mivel ezek a termékek a tejsavas fermentáció eredményeképpen az alapanyaghoz képest táp-, és ízanyagokban gazdagabbak, ugyanakkor antinutritív anyagokban szegényebbek. Emellett ezek az élelmiszerek biztonságosabbak is, mivel a tejsavbaktériumok anyagcseréjük során számos antimikrobás hatású vegyületet termelnek, amelyek gátolják, illetve megakadályozzák a romlás-, és kórokozó mikroorganizmusok elszaporodását a termékben. Mindezekon felül a tejsavbaktériumok biztonságosan felhasználható, ún. GRAS (Generally Recognized As Safe) kategóriájú mikroorganizmusok. Nem meglepő tehát, hogy a tejsavbaktériumok az elsők között szerepelnek, mint a káros mikrobák ellen felhasználható, potenciális biokontroll szervezetek.

A tejsavbaktériumok és antibakteriális anyagcseretermékeik nem csupán az élelmiszer-mátrixokban lehetnek hatásosak, hanem az élelmiszerelőállító üzemek felületeinek védelme során is. A kórokozó baktériumok megtelepedésének megakadályozására egy lehetséges megoldás lehet a patogének más, biztonságos baktériumokkal való kizárása az élelmiszerelőállító üzemekből. A kompetitív mikrobafajok által okozott gátló hatások a kötőhelyekért és tápanyagokért való versengés, az antimikrobás anyagok és a gátló hatású extracelluláris polimer mátrix (EPS) termelése.

Az élelmiszerek előállításában és tartósításában betöltött szerepük mellett a tejsavbaktériumok részt vesznek az egészséges bélmikrobióta megteremtésében is. A bélmikrobióta egyensúlya egészséges felnőttekben stabil, azonban egyes külső körülmények (pl. fertőzések, gyógyszeres kezelés – főként antibiotikumokkal –, egyoldalú táplálkozás) vagy belső változások (öregedés, az immunrendszer meggyengülése, a bél nyálkahártya-gátjának sérülései, stb.) hatására felborulhat és a káros mikroorganizmusok irányába tolódhat el. Ezek a mikrobák kellemetlen bélrendszeri tüneteket, megbetegedéseket okozhatnak, az általuk termelt toxinok illetve fekális enzimek hozzájárulhatnak a vastagbélrák kialakulásához. Az egészséges állapot helyreállítása, a különböző bélrendszeri megbetegedések megelőzése és gyógyítása érdekében a jótékony hatású mikroorganizmusok (tejsavbaktériumok, bifidobaktériumok, stb.) felé kell eltolni a bélmikrobióta összetételét. Ez elősegíthető az említett mikrobák (ún. probiotikumok) és/vagy a szaporodásukat/aktivitásukat *in vivo* szelektíven serkentő – a gazda számára emészthetetlen – élelmiszeralkotók (ún. prebiotikumok) fogyasztásával. A potenciálisan probiotikus mikroorganizmusoknak számos általános mikrobiológiai, technológiai és

funkcionális kritériumnak kell megfelelniük, hogy később sikeresen alkalmazhatók legyenek a különböző probiotikus termékekben. Ezen kívül elengedhetetlen a jótékony egészségi hatás megléte, amelyet tudományos kísérletekkel kell alátámasztani az engedélyezett/kereskedelmi forgalomba kerülés előtt. A legtöbb élettani hatás kiváltásához valamint a kórokozók adhéziójának megakadályozásához szükséges, hogy a probiotikum megkötődjön a bélhámsejtek felszínén. A megtapadás ezen kívül az első lépés afelé, hogy a törzs kolonizálja, vagy legalábbis átmenetileg kolonizálja a bélcsatornát. Ebből adódóan a törzsek tapadási képességének vizsgálata fontos előteszt a probiotikumok szelektálása során.

A fentieket alapul véve a következő célkitűzéseket tettem: (1) tejsavbaktériumok és romlás/kórokozó baktériumok kölcsönhatásának vizsgálata rozsdamentes acél felületen, (2) jó adhéziós képességű tejsavbaktérium törzs(ek) szelektálása Caco-2 emberi bélhámsejt vonalon és a tapadás vizsgálata a sejtkoncentráció függvényében, (3) tejsavbaktériumok és kórokozó baktériumok kölcsönhatásának vizsgálata bélhámsejtek felszínén, (4) tejsavbaktériumok és romlás/kórokozó baktériumok kölcsönhatásának vizsgálata laboratóriumi táptalajban és folyékony élelmiszerekben.

Vizsgálatok

Baktériumtapadás vizsgálata rozsdamentes acélon. A vizsgálatok során egy tejsavbaktérium (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Lb), egy romlást okozó (*Pseudomonas fluorescens*, Ps) és egy kórokozó (*Listeria monocytogenes*, Lm) baktériumtörzsszel dolgoztam. A baktériumok tapadását AISI 304-es típusú, 2B simaságú rozsdamentes acél lapocskákra, ún. kuponokra (1,5 x 1,5 cm²) vizsgáltam. A baktériumokat foszfát pufferben szuszpendáltam, majd ismert koncentrációjú, egyedi (Lb, Ps, Lm) és kevert (Lb+Ps, Lb+Lm) tenyészeteket készítettem belőlük. Kétféle kísérleti beállítást alkalmaztam: (1) a kuponokat függőlegesen merítettem bele a baktérium szuszpenziókba, majd 24 órán át, 30°C-on 150 rpm-en történő rázatás mellett inkubáltam őket, (2) a baktérium szuszpenziókból alikvot mennyiségeket pipettáztam a vízszintes helyzetű kuponokra, majd 3 órás inkubációt alkalmaztam 30°C-on, statikusan, telített páratartalmú kamrákban. Az első beállítás esetében a tapadó baktériumok kimutatására kétféle módszert alkalmaztam: (1) a baktériumokat vortexeléssel eltávolítottam a felületről, majd a csíraszámot szelektív táptalajokon határoztam meg, (2) a kuponok felületét fluoreszcens festékekkel megfestettem, majd megfelelő számú mikroszkópos látótéren meghatároztam a baktériumok által beborított terület arányát (borítottsági %). A második kísérleti beállítás esetében mikroszkópos baktériumszámlálást alkalmaztam. A tenyésztési eredmények statisztikai értékelésére Poisson-eloszlás vizsgálatot végeztem, a borítottsági értékeket két szempontos varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztem.

A vízszintes kupon esetében meghatározott baktériumszámokat Welch-próbával hasonlítottam össze.

Baktériumtapadás vizsgálata bélhámsejteken. A kísérletekben 11 élelmiszer-eredetű *Lactobacillus* törzset, egy *Bifidobacterium bifidum* és egy *Escherichia coli* törzset használtam fel. A baktériumok tapadását emberi vastagbél adenokarcinoma sejtvonalon (Caco-2) vizsgáltam 24-lyukú tenyésztőedényekben. A tapadásvizsgálatokhoz a baktériumokat a sejttenyésztéshez használt médiumban (DMEM) szuszpendáltam, majd meghatározott koncentrációkban helyeztem a sejtekre, amelyekkel 1 órán keresztül inkubáltam 37°C-on, statikusan, 5% CO₂-ot tartalmazó párasított légtérben. A tapadó baktériumok kimutatására tenyésztési módszert, valamint mikroszkópos sejtszámlálást alkalmaztam. A bélhámsejteken végzett vizsgálatok a következő alkísérletekre oszlottak: (1) a különböző detektálási módszerek összehasonlítása, (2) a vizsgálatokba bevont *Lactobacillus* törzsek tapadási képességének tesztelése, (3) a legjobban tapadó *Lactobacillus* törzs tapadása a kiindulási koncentráció függvényében, (4) a legjobban tapadó *Lactobacillus* törzs és az *E. coli* versengő tapadása. Az eredmények statisztikai értékelésére Poisson-eloszlást és Mann-Whitney próbát alkalmaztam.

Versengő szaporodás vizsgálata folyékony tápközegben. A tejsavbaktériumok és kórokozó baktériumok kompetitív kölcsönhatását szintetikus tápközegben és folyékony élelmiszerekben is megvizsgáltam a következő kísérleti beállítások szerint: (1) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* és *Bacillus cereus* (beoltás vegetatív sejtekkel illetve spórákkal) együtt szaporítása Plate Count Broth (PCB) táplevesben és 0,1% zsírtartalmú tejben 30°C-on, statikusan; (2) *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* és *Escherichia coli* együtt szaporítása 7,5% szárazanyagtartalmú csicsókalében 25°C-on, majd tárolása 12°C-on, statikusan. A tenyészetekből a kioltási időpontokban szelektív táptalajokon meghatároztam a csíraszámot valamint pH-t mértem. A PCB táplevesben végzett vizsgálat során a *Bacillus cereus* vegetatív sejtek és spórák számát egyaránt meghatároztam.

Kísérleti eredmények

Baktériumtapadás vizsgálata rozsdamentes acélon. Függőleges helyzetű kupon: a tenyésztési csíraszám meghatározás eredménye alapján megállapítottam, hogy a tejsavbaktériumoknak kb. 0,1%-a tapadt a felülethez. Ugyanakkor ez az eredmény nem volt reprodukálható a kísérlet minden egyes ismétlésében. A *Pseudomonas* sejteknek kb. 10%-a, a *Listeria* sejteknek kb. 1%-a tapadt az acélkuponokhoz - reprodukálható eredményeket adva. Az utóbbi két esetben ezért el tudtam végezni az egyedi és kevert tenyészetek statisztikai összehasonlítását: megállapítottam, hogy a tejsavbaktérium jelenlétében szignifikánsan több

Pseudomonas-sejt illetve szignifikánsan kevesebb *Listeria*-sejt tapadt az acélhoz, mint egyedi tenyészetben. Mikrobiológiai szempontból azonban a különbség nem volt releváns. A tenyésztési eredményekhez hasonló eredményeket adott a mikroszkópos vizsgálat is: a *Lactobacillus* általi borítottság a négy ismétlésben széles határok között változott, míg a *Pseudomonas* és a *Listeria* tapadása jól mérhető, reprodukálható eredményeket adott. A statisztikai értékelést ebben az esetben is csak az utóbbi eredményekre végeztem el: kevert tenyészetben szignifikánsan több *Pseudomonas* sejt tapadt, mint egyediben. A *Listeria monocytogenes* ezzel szemben kevert tenyészetben szignifikánsan kisebb mértékű tapadást mutatott, mint egyedi tenyészetben. Azonban tekintettel arra, hogy a *Lactobacillus* legalább két nagyságrenddel kisebb mennyiségben volt csak jelen a kupon felületén, a csökkenés feltehetően nem a tejsavbaktériumok hatásának volt köszönhető.

Vízszintes helyzetű kupon: mivel a tejsavbaktériumok tapadását nem tudtam reprodukálható módon lemérni függőleges helyzetű kuponon – elsősorban a nagyméretű *Lactobacillus* sejtek gyors kiüledése miatt – ezért a vizsgálatokat vízszintesen elhelyezett kuponokon folytattam. A *Lactobacillus* tapadásának mértéke hasonló volt az egyedi és a romlás/kórokozók kevert tenyészetekben, (bár statisztikailag kimutatható volt a csökkenés a *P. fluorescens* jelenlétében, ami arra utal, hogy a romlást okozó baktérium kis mértékben ugyan, de gátolta a tejsavbaktérium tapadását). Ezzel szemben mind a *P. fluorescens*, mind a *L. monocytogenes* nagyobb mértékben tapadt a tejsavbaktérium mellett, mint egyedül. A mikroszkópos felvételek tanúsága szerint a *Pseudomonas* és *Listeria* sejtek nem csupán az acél felületéhez tapadtak, hanem magukhoz a tejsavbaktériumokhoz is; feltehetőleg ezzel segítette elő a *Lactobacillus* a romlás/kórokozó baktériumok tapadását

Baktériumtapadás vizsgálata bélhámsejteken. Különböző detektálási módszerek összehasonlítása: három baktérium törzs (*Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2750, *Lb. sakei* DSM20017, *B. bifidum* B3.2) esetében hasonlítottam össze tapadó baktériumok kimutatására alkalmas módszereket. Megállapítottam, hogy a tenyésztéssel és a Gram-festést követő sejtszámlálással kapott eredmények jól egyeznek egymással, kivéve ha a baktériumtörzs erős aggregátum képző hajlamot mutat (pl. a 2750 számú törzs), mivel ebben az esetben az aggregátumokból csak egy-egy telep nő ki a táptalajon, és ezért a módszer alábecsülheti a tapadó baktériumok számát. A fluoreszcensen festett készítményeken a baktériumok mellett a bélhámsejtek egyes sejtalkotói (elsősorban a sejtmagok) is látszódtak, és ezek a műtermékek zavarták a kiértékelést. Az alkalmazott fluoreszcens festék nem-specifikus módon kötődik a nukleinsavakhoz, emiatt jelölte a Caco-2 sejtek nukleinsavait az alapos kimosás ellenére is. Ebből adódóan ez a festési eljárás nem bizonyult megfelelőnek ebben a modell kísérletben. Végül meghatároztam a tapadó baktériumok száma és a borítottsági % közti összefüggést: ez

mindhárom baktériumtörzs esetében lineárisnak adódott és a regressziós koefficiens szoros összefüggést mutatott. Ebből arra következtettem, hogy a borítottsági % értékek is alkalmasak arra, hogy a törzsek adhéziós képességét összehasonlítsam, feltételezve, hogy a baktérium sejtek hasonló méretűek.

A vizsgálatokba bevont Lactobacillus törzsek tapadási képességének tesztelése: a törzsek közül a *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 bizonyult a legjobban tapadó tejsavbaktériumnak (1,84% borítottság), ezért ezt a törzset választottam ki a további vizsgálataimhoz.

A legjobban tapadó Lactobacillus törzs tapadása a kiindulási koncentráció függvényében: a kiválasztott 2749 számú törzs hígításaiból kb. 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 telepkepző egység (TKE)/lyuk baktérium szuszpenziót adtam a Caco-2 sejtekhez, majd a megtapadó baktériumok számát tenyésztéses módszerrel és mikroszkópos sejtszámlálással detektáltam. Megállapítottam, hogy a mikroszkópos vizsgálati módszerrel szűkebb koncentráció tartományban (10^6 - 10^7) voltak vizsgálhatóak a tapadó baktériumok, mint a táptalajon való csíraszám meghatározással (10^4 - 10^8), azaz ez utóbbi érzékenyebb módszernek bizonyult. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált tejsavbaktérium törzs koncentráció-függő módon tapadt, mivel a hozzáadott baktériumok számának növelésével arányosan nőtt a megtapadó baktériumok száma is. A megtapadó baktériumok aránya 7% volt a 10^6 - 10^9 baktérium/lyuk hozzáadott baktériumszám esetén. A vizsgált koncentráció tartományban nem alakult ki plató állapot, ami arra utalhat, hogy az alkalmazott legnagyobb koncentrációnál sem telítődtek a kötőhelyek a Caco-2 sejten. A tapadó baktériumok mikroszkópos képe ugyanakkor azt mutatta, hogy a baktériumok egymásra rétegződtek, egymáshoz tapadtak és jelentős részük már nem érte el a Caco-2 sejtek felszínén lévő specifikus receptor molekulákat.

A legjobban tapadó Lactobacillus törzs és az E. coli versengő tapadása: A kísérletekből ellentmondásos eredmények születtek. Ennek ellenére a kapott adatok alapján le lehetett vonni néhány óvatos következtetést: a tejsavbaktérium jelenléte feltehetőleg nem befolyásolta az *E. coli* tapadásának mértékét, ugyanakkor a kórokozó sejtek egy része elpusztulhatott illetve megsérülhetett (VBNC állapotba kerülhetett) kevert tenyészetben – valószínűleg a tejsavbaktériumok anyagcsere termékei hatása miatt. A tejsavbaktérium tapadását ezzel szemben támogatta az *E. coli* jelenléte. Tekintettel a tapasztalt ellentmondásokra, a két baktérium kölcsönhatását Caco-2 sejteken tovább kell vizsgálni.

Versengő szaporodás vizsgálata folyékony tápközegekben. A *Lc. lactis* subsp. *lactis* és a *B. cereus* egyaránt jól szaporodott a szintetikus (PCB) tápközegben 30°C-on. Az egyedi és kevert tenyészetek vizsgálata alapján megállapítottam, hogy a *B. cereus* nem befolyásolta a tejsavbaktérium szaporodását, ugyanakkor a *Lc. lactis* jelenléte gátolta a kórokozót. A gátlás

oka elsősorban a kis pH, a savhatás és a tápanyagkimerülés volt, valamint nem kizárható a bakteriocin (nizin) hatása sem. A *B. cereus* a kedvezőtlen körülmények következtében a beoltás után néhány órával spórázni kezdett, és a vizsgálati idő végére a sejtek már szinte kizárólag spóra állapotban voltak jelen. A tejsavbaktérium baktericid hatása tehát érvényesült a *B. cereus* vegetatív sejtjein, azonban teljes elimináció nem következett be, mivel a sejtek spóra állapotba „menekültek” a kedvezőtlen körülmények között. Hasonlóképpen jó tápközegnek bizonyult a baktériumok számára a 0,1% zsírtartalmú tej is. Azonban szemben a PCB-ben megfigyelt változásokkal, a baktériumok csíraszám-változásai hasonlóan alakultak az egyedi és kevert tenyészetben is, ami arra utal, hogy egyik baktérium sem zavarta a másik szaporodását jelentős mértékben. A gátló hatás elmaradását elsősorban a tej jó pufferoló képessége és tápanyagokban gazdagabb volta okozhatta. A *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* és az *E. coli* egyaránt jó szaporodott a 7,5%-os csicsókalében 25°C-on. Kevert tenyészetben a tejsavbaktérium az egyedi tenyészettel azonos szaporodást mutatott, az *E. coli* szaporodása ezzel szemben jelentősen gátlódott a tejsavbaktérium jelenlétében (2 log egység csökkenés az egyedi tenyészethez képest). A 12°C-on történő tárolás során nem történt jelentős változás, a hűtőhőmérséklet már csak „konzerválta” az addig kialakult állapotot.

Következtetések és javaslatok

A tejsavbaktériumok egyszerű anyagcseréjű szervezetek: szénhidrátokból szigorúan fermentatív módon nyernek energiát, amely jóval kevesebb ATP-t eredményez, mint a biológiai oxidáció. Emellett összetett igényük van fehérjékre, szénhidrátokra, sókra, vitaminokra, stb. Az előbbiekből következik, hogy könnyen hátrányba kerülhetnek a gyorsabban szaporodó aerob szervezetekkel szemben, illetve tápanyagokban szegényebb környezetekben.

Eredményeim arra hívják fel a figyelmet, hogy tejsavbaktériumok védőkultúráként való felhasználása nagy körültekintést igényel. A sikeres alkalmazás érdekében, (1) javasolt a tejsavbaktériumokat más antimikrobás kezelésekkel kombinációban használni, (2) jelentős szerepe van a megfelelő törzsek kiválasztásának valamint (3) a tejsavbaktériumok anyagcseréjét és szaporodását támogató körülmények beállításának (tápanyagok, hőmérséklet, légtér összetétele, stb.), amelyek egyidejűleg lehetőleg a káros mikroorganizmusok tevékenységét is hátráltatják.

8. SUMMARY

Introduction

Foods fermented with lactic acid bacteria (LAB) have an essential role in human diet as - due to the fermentation process – these products have a higher nutritional value and contain more aroma compounds, and at the same time less antinutritive substances than the raw materials. Besides, these foods are considered safer because LAB produce different types of antimicrobial compounds which inhibit the growth of pathogenic and food spoilage microorganisms in the product. Moreover LAB can be used safely in food as they are GRAS (generally recognised as safe) microorganisms. Therefore it is not surprising that LAB are chosen first when researchers look for potential biocontrol organisms.

LAB and their antimicrobial metabolites can be effective not only in food matrices but also in case of food processing plant surfaces. A possible solution can be to inhibit the colonisation by pathogenic bacteria using safe bacteria. Inhibition exerted by competitive microbes are competition for adhesion sites and nutrients, production of antimicrobial metabolites and inhibitory extracellular polymeric substance (EPS).

Besides their role in food production and food preservation LAB take part in the establishment of the healthy intestinal microbiota. The balance of intestinal microbiota is stable in healthy adults, however, it can be altered by certain external factors (i.e. contaminations, medical treatments – especially with antibiotics, unbalanced diet) or internal changes (aging, impairment of the immune system, damages of intestinal mucosa barrier, etc.) and therefore can be shifted towards the harmful microorganisms. These microbes can cause unpleasant intestinal symptoms, and the toxins and faecal enzymes produced can contribute to the development of colon cancer. In order to restore the healthy conditions and prevent and treat different gastrointestinal disorders the composition of intestinal microbiota should be shifted towards beneficial microorganisms (i.e. lactobacilli, bifidobacteria). This can be facilitated by consumption of the previously mentioned microbes (so called probiotics) and/or food additives – indigestible by the host – which selectively stimulate their growth/activity in vivo (so called prebiotics). Potential probiotic microorganisms have to fulfil several general microbiological, technological and functional criteria in order to be applicable successfully in probiotic products. Moreover, the existence of beneficial impact on health is crucial, and has to be proven in scientific experiments in advance to authorisation/marketing. Adhesion of probiotics to intestinal epithelial cell surfaces is necessary to generate several physiological effects and to inhibit the adherence of pathogens. In addition, adhesion is the first step

towards the colonisation, albeit transient, of the gastrointestinal (GI) tract by the probiotic strains. Therefore investigation of adhesion ability of potential probiotic strains is an important assay in the screening process.

On the basis of the above mentioned facts my aims were the followings: (1) investigation of the interaction between LAB and food pathogenic and/or spoilage bacteria on stainless steel surface; (2) selection of LAB strain(s) with good adhesion abilities to Caco-2 human intestinal epithelial cell line, and investigation of adhesion as a function of initial cell count; (3) investigation of interaction between LAB and pathogenic bacteria on epithelial cell surfaces; (4) investigation of LAB and food pathogenic/spoilage bacteria in synthetic media and in liquid foods.

Experiments

Investigation of bacterial adhesion to stainless steel. In these experiments *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* as LAB, *Pseudomonas fluorescens* as food spoilage microbe and *Listeria monocytogenes* as pathogen were used. Bacterial adhesion was investigated on stainless steel coupons (type 304, 2B finish, 1.5 by 1.5 cm²). Bacteria were suspended in phosphate buffered saline then single and mixed cultures of known concentration were prepared. Two sets of experiments were designed: (1) coupons were inserted vertically into the bacterial suspensions and were incubated at 30°C for 24 hours shaking at 150 rpm; (2) aliquote volumes of the bacterial suspensions were dispensed on horizontally inserted coupons and were incubated at 30°C for 3 hours statically in humidity chamber. In the first set of experiments adhered bacteria were detected by two different methods: (1) bacteria were detached from the surface by vortexing and bacterial counts were determined on selective medium; (2) the surfaces of the coupons were stained with fluorescent dyes and ratio of bacterial coverage (% coverage) was determined using epifluorescent microscopy. In the second set of experiments the number of bacteria was determined by microscopic counting. Results were analysed statistically with Poisson distribution, ANOVA and Welch test.

Investigation of bacterial adhesion on intestinal epithelial cells. In these experiments 11 *Lactobacillus* strains of food origin, one *Bifidobacterium* strain and one *Escherichia coli* strain were used. Bacterial adhesion was investigated on human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) in 24-well tissue culture plates. For adherence tests bacteria were suspended in cell culture medium (DMEM) then were placed in known concentration onto the Caco-2 cells and incubated at 37°C for 1 hour statically in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Adherent bacteria were determined by plating and microscopic cell counting. Experiments on intestinal epithelial cells were divided into four sub-experiments: (1) comparison of different

detection methods; (2) screening of the adhesion ability of the 11 *Lactobacillus* stains; (3) investigation of adhesion of the selected *Lactobacillus* strain depending on the initial bacterium cell concentration; (4) competitive adhesion of the selected *Lactobacillus* strain and *E. coli*. Statistical analysis was carried out with Poisson distribution and Mann-Whitney test.

Investigation of competitive growth in liquid culture media. Competitive interactions between LAB and pathogenic bacteria were investigated in synthetic media and in liquid food matrices according to the followings: (1) static co-culturing of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Bacillus cereus* (vegetative cells or spores) in Plate Count Broth (PCB) and in skim milk (0.1% fat content) at 30°C for 72 hours ; (2) static co-culturing of *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* and *E. coli* in Jerusalem artichoke juice (7.5% dry material content) at 25°C for 48 hours, then storing at 12°C. At certain intervals the cell counts were determined by plating on selectice media and the pH was measured. In case of co-culturing in PCB counts of *B. cereus* vegetative cells and spores were determined separately.

Results

Investigation of bacterial adhesion to stainless steel. Vertically inserted coupon: based on the plating method it was found that 0.1% of the lactobacilli adhered to the surface. However, this result was not reproducible in each replication of the experiment. Ten percent of *Pseudomonas* cells and 1% of *Listeria* cells adhered to the stainless steel coupon – these results were reproducible. In case of mixed cultures in the presence of LAB statistically more *Pseudomonas* cells and less *Listeria* cells adhered to the steel surface than in single cultures, however, microbiologically the difference was not relevant. Microscopic investigation showed similar results: percentage coverage of *Lactobacillus* varied greatly in the four replicates, while adhesion of *Pseudomonas* and *Listeria* was easily measurable and results were replicable. Statistical analysis was carried out again in the two latter cases: *Pseudomonas* attached better in single culture than in mixed culture. *L. monocytogenes*, however, showed smaller adhesion in mixed than in single culture. Regarding that *Lactobacillus* was present on the coupon at least two log cycles less than the *Listeria*; decrease in *Listeria* number probably was not impact of LAB.

Horizontally inserted coupon: as it was impossible to measure the degree of adhesion of LAB on vertically inserted coupon reproducibly – mainly because of the fast sedimentation of the large cells – the experiments were carried out on vertically inserted coupons. The degree of adhesion of *Lactobacillus* was similar in single cultures and mixed with pathogenic and/or spoilage bacteria. (However, there was a small decrease in the presence of *P. fluorescens*, which indicates that the food spoilage bacterium slightly hindered the adhesion of LAB.)

Despite of this both *Pseudomonas* and *Listeria* showed greater adhesion in the presence of LAB than alone. Microscopic images showed that *Pseudomonas* and *Listeria* cells attached not only to the steel surface but to the lactic acid bacteria themselves; *Lactobacillus* presumably aided the adhesion of food pathogenic/spoilage bacteria this way.

Investigation of bacterial adhesion to intestinal epithelial cells. Comparison of different detection methods: methods suitable to detect adherent bacteria were compared in case of three bacterium strains (*Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2750, *Lb. sakei* DSM20017, *B. bifidum* B3.2). It was found that there was a good correlation between the results obtained by plating and the microscopic counting of Gram-stained cells except when the bacterium strain showed strong autoaggregating ability (i.e. in case of strain 2750), because in this case one colony would grow from a cell aggregate (instead from one cell only), therefore this method may underestimate the cell count. On microscopic images stained with fluorescent dye intestinal epithelial cell components (mainly nuclei) appeared as well along with the bacteria and this artefact hampered the quantification. The fluorescent dye applied binds to nucleic acids in a non-specific way so it also attached also to the nucleic acids of Caco-2 cells despite of the thorough washing. This staining method, therefore, was not found satisfactory in this model system. Finally the correlation between bacterial cell count and percentage coverage was determined: it was found to be linear in cases of all the three strains and regression coefficients showed close correlations. It was concluded that percentage coverage is also a suitable index to compare the adhesion ability of the candidate strains. However, the cell sizes have to be similar.

Screening the adhesion ability of 11 Lactobacillus stains: it was found that *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 2749 showed the highest adhesion (1.84% coverage) to the Caco-2 cells among the tested strains; therefore this strain was chosen for further investigations.

Investigation of adhesion of the selected Lactobacillus strain as a function of the initial bacterial cell count: dilutions of the bacterium suspension of the selected strain (appr. 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 colony forming unit (CFU)/well) were added to the Caco-2 cells, and then the adherent bacteria were detected using plating and microscopic cell counting. It was found that microscopic method enabled the detection of the adherent bacteria in a narrower range (10^6 - 10^7) than the plate counting (10^4 - 10^8) so the latter method proved to be the more suitable method. Results showed that the *Lactobacillus* strain investigated attached in a concentration-dependent manner as increasing number of added bacteria resulted in a proportionally increasing number of adherent bacteria. Ratio of adherent bacteria was 7%, when number of added bacteria was 10^6 - 10^9 bacteria/well. In the concentration range investigated there was no plato stage. This implies that binding sites on the Caco-2 cell

surface were not saturated even at the highest added bacterium count. Microscopic images of adherent bacteria, however, showed that the bacterium cells attached to each other and made layers on top of each other and many of the cells were not able to reach the specific receptor molecules.

Competitive adhesion of the selected Lactobacillus strain and E. coli: results of these experiments turned out to be contradictory. In spite of this it was possible to draw some conclusions based on the data: presence of LAB presumably did not have any effect on the adhesion of the pathogen, however, a certain part of the *E. coli* cells might have died or injured (probably became VBNC) in mixed culture due to the metabolites of lactic acid bacteria. At the same time presence of *E. coli* aided the adhesion of *Lactobacillus*. In consideration of the inconsistencies further investigations needed to reveal the interactions between the two bacterium strains on Caco-2 cells.

Investigation of competitive growth in liquid culture media. Both *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *B. cereus* were able to grow well in synthetic medium (PCB) at 30°C. Based on investigation of single and mixed cultures it was found that *B. cereus* did not have any impact on the growth of lactic acid bacterium, however, presence of *Lc. lactis* inhibited the pathogene. The main reasons of inhibition were the low pH, the impact of acids and nutrient depletion, furthermore the inhibitory impact of bacteriocin (nisin) can also be possible. As a consequence of the unfavourable conditions *B. cereus* started to form spores already a few hours after inoculation. By the end of the incubation period almost all the *B. cereus* cells were present as spores. The lactic acid bacteria might have a bactericidal impact on the vegetative cells of *B. cereus*, but complete elimination did not occur as cells “escaped” to spore state because of the unfavourable conditions.

Similarly, skim milk turned out to be a proper medium for both stains. However, unlike in PCB, both *Lc. lactis* and *B. cereus* could grow equally well in single and mixed cultures, which implies that neither of them hindered the growth of the other. Lack of inhibition might have occurred because of the good buffer capacity and rich nutrient content of the milk.

Both *Lb. casei* subsp. *casei* and *E. coli* could grow well in Jerusalem artichoke juice at 25°C. In mixed culture LAB showed the same growth rate as in single culture, however, growth of *E. coli* was inhibited in the presence the lactobacilli (2 log cycle decrease compared to the single culture). During storage at 12°C there was no any significant change, low temperature only “conserved” the existing state.

The metabolism of LAB is relatively simple due to their complex nutritional requirements and obligate fermentative nature. This type of metabolism results in less ATPs as biological

oxidation. Therefore LAB can be put at a disadvantage in contrast to aerobic organisms, and in environments poor in nutritional resources.

Results of this study indicate that application of LAB as protective cultures has to be dealt with great care. In order to a successful application it is suggested (1) to use LAB in combination with other antimicrobial treatments; and (2) strain selection and (3) selection of conditions supporting metabolism and multiplication of LAB but hindering that of the harmful bacteria (nutrients, temperature, composition of the atmosphere, etc.) have a great role.

9. MELLÉKLETEK

M.1. Felhasznált irodalom

- ABEE, T., ROMBOUITS, F. M., HUGENHOLTZ, J., GUIHARD, G., LETELLIER, L. (1994): Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (6) 1962-1968. p.
- ALAKOMI, H.-L., SKYTTÄ, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I. M. (2000): Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5) 2001-2005. p.
- ARNOLD, J. W., BAILEY, G. W. (2000): Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Science*, 79 (12) 1839-1845. p.
- BAIK, H. S., BEARSON, S., DUNBAR, S., FOSTER, J. W. (1996): The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. *Microbiology*, 142, 3195-3200. p.
- BANKS, M. K., BRYERS, J. D. (1991): Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (7) 1974-1979. p.
- BECZNER, J. (2001): Biofilm – a challenge to the food industry. *Acta Alimentaria*, 30 (4) 329-331. p.
- BELFIORE, C., CASTELLANO, P., VIGNOLO, G. (2007): Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiology*, 24, 223-229. p.
- BENECH, R.-O., KHEADR, E. E., LARIDI, R., LACROIX, C., FLISS, I. (2002): Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8) 3683-3690. p.
- BENEDICT, R. C., PARTRIDGE, T., WELLS, D., BUCHANAN, R. L. (1993): *Bacillus cereus*: Aerobic growth kinetics. *Journal of Food Protection*, 56 (3) 211-214. p.
- BENKERROUM, N., SANDINE, W. (1988): Inhibition action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 71 (12) 3237-3245. p.
- BEUCHAT, L. R., CLAVERO, M. R. S., JAQUETTE, C. B. (1997): Effects of nisin and temperature on survival, growth, and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (5) 1953-1958. p.
- BIANCHI, M. A., DEL RIO, D., PELLEGRINI, N., SANSEBASTIANO, G., NEVIANI, E., BRIGHENTI, F. (2004): A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 301-305. p.
- BLUM, S., RENIERO, R., SCHIFFRIN, E. J., CRITTENDEN, R., MATTILA-SANDHOLM, T., OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., SAARELA, M., SAXELIN, M., COLLINS, K., MORELLI, L. (1999): Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 405-410. p.

- BOOTH, I. R., KROLL, R. G. (1989): The Preservation of Foods by Low pH. 119-160. p. In: GOULD, G. W. (Szerk.): *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Essex: Elsevier Science Publishers Ltd, UK, 441 p.
- BORUCKI, M. K., PEPPIN, J. D., WHITE, D., LOGE, F., CALL, D. R. (2003): Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12) 7336-7342. p.
- BRIANDET, R., MEYLHEUC, T., MAHER, C., BELLON-FONTAINE, M. N. (1999): *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12) 5328-5333. p.
- BUCHANAN, R. L., BAGI, L. K. (1997): Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Food Protection*, 60, 254-261. p.
- CARPENTIER, B., CHASSAING, D. (2004): Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97 (2) 111-122. p.
- CHAE, M. S., SCHRAFT, H. (2001): Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Microbiology*, 18, 103-112. p.
- CHAMPOMIER-VERGÉS, M.-C., MAGUIN, E., MISTOU, M.-Y., ANGLADE, P., CHICH, J.-F. (2002): Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B*, 771, 329-342. p.
- CHAVANT, P., MARTINIE, B., MEYLHEUC, T., BELLON-FONTAINE, M. N., HEBRAUD, M. (2002): *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2) 728-737. p.
- CHIGO, J.-M. (2001): Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*. 412, 442-445. p.
- COOLEY, M. B., CHAO, D., MANDRELL, R. E. (2006): *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection*, 69 (10) 2329-2335. p.
- CORLETT, D. A., Jr., BROWN, M. H. (1980): pH and Acidity. 92-111. p. In: SILLIKER, J. H., ELLIOTT, R. P., BAIRD-PARKER, A. C., BRYAN, F. L., CHRISTIAN, J. H. B., CLARK, D. S., OLSON, J. C., Jr., ROBERTS, T. A. (Szerk.): *Microbial ecology of foods*. Vol. 1. *Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. New York: Academic Press, Inc., USA, 332 p.
- COSENTINO, S., PALMAS, F. (1997): Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's-milk-processing plants in Sardinia, Italy. *Journal of Food Protection*, 60 (3) 283-287. p.
- CROCIANI, J., GRILL, J.-P., HUPPERT, M., BALLONGUE, J. (1995): Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 146-148. p.
- DEÁK, T. (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 382 p.
- DEGNAN, A. J., BUYONG, N., LUCHANSKY, J. B. (1993): Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *International Journal of Food Microbiology*, 18, 127-138. p.

- DELVES-BROUGHTON, J. (1990): Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, 44 (11) 100-117. p.
- DEL RE, B., SGORBATI, B., MIGLIOLI, M., PALENZONA, D. (2000): Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 438-442. p.
- DE ROSA, S., SCONZA, F., VOLTERRA, L. (1998): Biofilm amount estimation by fluorescein diacetate. *Water Research*, 32 (9) 2621-2626. p.
- DONLAN, R. M. (2002): Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9) 881-890. p.
- DOYLE, M. P. (1988): *Bacillus cereus*. 199. p. In: Bacteria associated with foodborne diseases. *Food Technology*, 42 (4) 181-200. p.
- DRAGO, L., GISMONDO, M. R., LOMBARDI, A., DE HAËN, C., GOZZINI, L. (1997): Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters*, 153, 455-463. p.
- DUFRENNE, J., BIJWAARD, M., TE GIFFEL, M., BEUMER, R., NOTERMANS, S. (1995): Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 27 (2-3) 175-183. p.
- ENNAHAR, S., ASSOBEI, O., HASSELMANN, C. (1998): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *Journal of Food Protection*, 61, 186-191. p.
- FARKAS, J. (2002): Új, nem termikus módszerek élelmiszerek mikrobiológiai biztonságának és minőség-megőrzésének javítására. *Élelmészeti Ipar*, LVI. (6) 164-170. p.
- FARKAS, J., ANDRÁSSY, É., BECZNER, J., VIDÁCS, I., MÉSZÁROS, L. (2002): Utilizing luminometry for monitoring growth of *Listeria monocytogenes* in its liquid or gelified monocultures and cocultures with "acid-only" *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 159-170. p.
- FONDÉN, R., SAARELA, M., MÄTTÖ, MATTILA-SANDHOLM, T. (2003): Lactic acid bacteria (LAB) in functional dairy products. 245-262. p. In: MATTILA-SANDHOLM, T., SAARELA, M. (Szerk.): Functional Dairy Products. Abington: Woodhead Publishing Ltd., England, 395. p.
- FORESTIER, C., DE CHAMPS, C., VATOUX, C., JOLY, B. (2001): Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 152, 167-173. p.
- GAGNON, M., KHEADR, E. E., LE BLAY, G., FLISS, I. (2004): In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 69-78. p.
- GÄNZLE, M. G., HERTEL, C., VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M., HAMMES, W. P. (1999): Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 21-35. p.
- GARCERÁ, M. J. G., ELFERINK, M. G. L., DRIESSEN, A. J. M., KONINGS, W. N. (1993): In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of protonmotive force and lipid composition. *European Journal of Biochemistry*, 212, 417-422. p.
- GIBSON, G. R. (2004): Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2) 287-298. p.

- GIBSON, G. R., ROBERFROID, M. B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412. p.
- GILLILAND, S. E., SPECK, M. L. (1975): Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in nonfermented refrigerated foods. *Journal of Food Science*, 40 (5) 903-905. p.
- GORSKI, L., PALUMBO, J. D., NGUYEN, K. D. (2004): Strain-specific differences in the attachment of *Listeria monocytogenes* to alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection*, 67 (11) 2488-2495. p.
- GOULD, G. W. (1996): Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*, Suppl, 82-86. p.
- HAMMES, W. P., VOGEL, R. F. (1995): The genus *Lactobacillus*. 19-54. p. In: WOOD, B. J. B., HOLZAPFEL, W. H. (Szerk.): The lactic acid bacteria. Vol. 2. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Blackie Academic and Professional, UK, 398 p.
- HANLIN, M. B., KALCHAYANAND, N., RAY, P., RAY, B. (1993): Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *Journal of Food Protection*, 56 (3) 252-255. p.
- HELKE, D. M., SOMERS, E. B., WONG, A. C. (1993): Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual components. *Journal of Food Protection*, 56 (6) 479-484. p.
- HENNING, S., METZ, R., HAMMES, W. P. (1986): Studies on the mode of action of nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 3, 121-134. p.
- HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U., HUIS IN'T VELD, J. H. J. (1998): Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85-101. p.
- HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJÖRKROTH, J., SCHILLINGER, U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(suppl), 365S-373S. p.
- HOLZAPFEL, W. H., SCHILLINGER, U. (2002): Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109-116. p.
- HURST, A. (1981): Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27, 85-123. p.
- JACOBSEN, C. N., ROSENFELDT NIELSEN, V., HAYFORD, A. E., MØLLER, P. L., MICHAELSEN, K. F., PÆRREGAARD, A., SANDSTÖRM, B., TVEDE, M., JAKOBSEN, M. (1999): Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (11) 4949-4956. p.
- JAQUETTE, C. B., BEUCHAT, L. R. (1998): Combined effects of pH, nisin, and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 61 (5) 563-570. p.
- JARVIS, B., FARR, J. (1971): Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 227, 232-240. p.
- JASSIM, S. A. A., HIBMA, A. M., GRIFFITHS, M. W. (2005): The attachment efficiency of cell-walled and L-forms of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 3 (2) 92-95. p.

- JIN, L. Z., HO, Y. W., ABDULLAH, N., ALI, M. A., JALALUDIN, S. (1998): Note: Lack of influence of adherent *Lactobacillus* isolates on the attachment of *Escherichia coli* to the intestinal epithelial cells of chicken in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1171-1174. p.
- JONES, L. W. (1974): Effect of butterfat on inhibition of *Staphylococcus aureus* by nisin. *Canadian Journal of Microbiology*, 20 (9)1257-1260. p.
- JUFFS, H. S., BABEL, F. J. (1975): Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperatures. *Journal of Dairy Science*, 58 (11) 1612-1619. p.
- JUNG, D.-S., BODYFELT, F. W., DAESCHEL, M. A. (1992): Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 75 (2) 387-393. p.
- KALCHAYANAND, N., HANLIN, M. B., RAY, B. (1992): Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 239-243. p.
- KALMOKOFF, M. L., AUSTIN, J. W., WAN, X.-D., SANDERS, G., BANERJEE, S., FARBER, J. M. (2001): Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 725-734. p.
- KIMOTO, H., KURISAKI, J., TSUJI, N. M., OHMOMO, S., OKAMOTO, T. (1999): Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 313-316. p.
- KIRJAVAINEN, P. V., OUWEHAND, A., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. J. (1998): The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 185-189. p.
- KLAENHAMMER, T. R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86. p.
- KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J., VUKOVIĆ, S., ŠIMPRAGA, M., FRECE, J., MATOŠIĆ, S. (2003): Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981-987. p.
- KUMAR, C. G., ANAND, S. K. (1998): Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9-27. p.
- LAY, C., RIGOTTIER-GOIS, L., HOLMSTRØM, K., RAJILIC, M., VAUGHAN, E. E., DE VOS, W. M., COLLINS, M. D., THIEL, R., NAMSOLLECK, P., BLAUT, M., DORÉ, J. (2005): Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4153-4155. p.
- LE BLAY, G., FLISS, I., LACROIX, C. (2004): Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 211-221. p.
- LEISTNER, L., GOULD, G. (2002): Hurdle technologies. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA, 194. p.
- LERICHE, V., CHASSING, D., CARPENTIER, B. (1999): Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 169-182. p.
- LERICHE, V., CARPENTIER, B. (2000): Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 594-605. p.

- LOVETT, J., TWEDT, R. M. (1988): *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. p. In: Bacteria associated with foodborne diseases. *Food Technology*, 42 (4) 181-200. p.
- LUND, B. M. (1990): Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *The Lancet*, 336, 982-986. p.
- LUNDEN, J. M., MIETTINEN, M. K., AUTIO, T. J., KORKEALA, H. J. (2000): Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63 (9) 1204-1207. p.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (2003): Brock Biology of Microorganisms, Tenth Edition. Upper Saddle River, New Jersey: Pearson Education, Inc., USA, 1019 p.
- MANSOUR, M., MILLIÈRE, J.-B. (2001): An inhibitory synergistic effect of a nisin-monolaurin combination on *Bacillus* sp. vegetative cells in milk. *Food Microbiology*, 18, 87-94. p.
- MARAGKOUidakis, P. A., ZOUMPOPOULOU, G., MIARIS, C., KALANTZOPOULOS, G., POT, B., TSAKALIDOU, E. (2006): Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189-199. p.
- MAREK, P., NAIR, M. K. M., HOAGLAND, T., VENKITANARAYANAN, K. (2004): Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 1-7. p.
- MAYER, Á., REZESSY-SZABÓ, J., BOGNÁR, CS., HOSCHKE, Á. (2003): Research for creation of functional foods with *Bifidobacteria*. *Acta Alimentaria*, 32 (1) 27-39. p.
- McGUIRE, J. (1989): A predictive model for food particle interactions with contact surfaces. *Journal of Food Science*, 54, 22-24, 29. p.
- MIETTINEN, M. K., BJÖRKROTH, K. J., KORKEALA, H. J. (1999): Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 187-192. p.
- MILLETTE, M., SMORAGIEWICZ, W., LACROIX, M. (2004): Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. *Journal of Food Protection*, 67 (6) 1184-1189. p.
- MIRON, J., BEN-GHEDALIA, D., MORRISON, M. (2001): Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84, 1294-1309. p.
- MONTANA STATE UNIVERSITY HONLAP: http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/Image_Library/Structure-Function/Full-image%20pages/CBE-03_BFin3steps.htm
- MORRIS, S. L., WALSH, R. C., HANSEN, J. N. (1984): Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *The Journal of Biological Chemistry*, 259 (21) 13590-13994. p.
- MORTON, L. H. G., GREENWAY, D. L. A., GAYLARDE, C. C., SURMAN, S. B. (1998): Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 247-259. p.
- MUFANDAEDZA, J., VILJOEN, B. C., FERESU, S. B., GADAGA, T. H. (2006): Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 147-152. p.

- MURIANA, P. M. (1996): Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection*, Suppl, 54-63. p.
- NEU, T. R., SWERHONE, G. D. W., LAWRENCE, J. R. (2001): Assessment of lectin-binding analysis for *in situ* detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology*, 147, 299-313. p.
- NORWOOD, D. E., GILMOUR, A. (1999): Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 576-582. p.
- NORWOOD, D. E., GILMOUR, A. (2001): The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 320-324. p.
- OGAWA, M., SHIMIZU, K., NOMOTO, K., TANAKA, R., HAMABATA, T., YAMASAKI, S., TAKEDA, T., TAKEDA, Y. (2001): Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 135-140. p.
- OUWEHAND, A. C., ISOLAURI, E., KIRJAVAINEN, P. V., TÖLKKÖ, S., SALMINEN, S. J. (2000): The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 10-13. p.
- PAP, K., SZILLI, M., KISKÓ, G. (2006): Testing antimicrobial efficiency of seven disinfectants against bacteria and fungi with surface test. *Acta Alimentaria*, 35 (2) 163-170. p.
- PARENTE, E., RICCIARDI, A. (1999): Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 628-638. p.
- PARK, Y.-K., BEARSON, B., BANG, S. H., BANG, I. S., FOSTER, J. W. (1996): Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 20, 605-611. p.
- PEEL, M., DONACHIE, W., SHAW, A. (1988): Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of General Microbiology*, 134 (8) 2171-2178. p.
- PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P., BELLON-FONTAINE, M. N. (1997): Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (5) 1725-1731. p.
- PINTO, M., ROBINE-LEON, S., APPAY, M.-D., KEDINGER, M., TRIADOU, N., DUSSAULX, E., LACROIX, B., SIMON-ASSMANN, P., HAFFEN, K., FOGH, J., ZWEIBAUM, A. (1983): Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47, 323-330. p.
- PITT, W. M., HARDEN, T. J., HULL, R. R. (2000): Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 63 (7) 916-920. p.
- POL, I. E., SMID, E. J. (1999): Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 166-170. p.
- POL, I. E., MASTWIJK, H. C., BARTELS, P. V., SMID, E. J. (2000): Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 428-430. p.

- POL, I. E., VAN ARENDONK, W. G. C., MASTWIJK, H. C., KROMMER, J., SMID, E. J., MOEZELAAR, R. (2001): Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4) 1693-1699. p.
- POLGÁR, M. (2004): A bélflóra kialakulása újszülöttekben, alakulásának és alakításának jelentősége csecsemő- és gyermekkorban. 18-28. p. In: SZAKÁLY, S. (Szerk.): *Probiotikumok és humánegészség. Vissza a természethez!* Mosonmagyaróvár: Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet, 52 p.
- RAUCH, P. J. G., DE VOS, W. M. (1992): Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 174 (4) 1280-1287. p.
- RODRÍGUEZ, E., TOMILLO, J., NUÑEZ, M., MEDINA, M. (1997): Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 389-395. p.
- ROGERS, L. A. (1928): The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 16 (5) 321-325. p.
- RYU, J.-H., DENG, Y., BEUCHAT, L. (1999): Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to reduced pH achieved with various organic acids. *Journal of Food Protection*, 62, 451-455. p.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E., SALMINEN, E. (1996): Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 347-358. p.
- SALMINEN, S., OUWEHAND, A., BENNO, Y., LEE, Y. K. (1999): Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, 10, 107-110. p.
- SASAHARA, K.C. and ZOTTOLA, E.A. (1993): Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*, 56 (12) 1022-1028. p.
- SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W. H. (1996): Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 7 (5) 158-164. p.
- SCHULTZ, M., WATZL, S., OELSCHLAEGER, T. A., RATH, H. C., GÖTTL, C., LEHN, N., SCHÖLMERICH, J., LINDE, H.-J. (2005): Green fluorescent protein for detection of the probiotic microorganism *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) in vivo. *Journal of Microbiological Methods*, 61, 389-398. p.
- SPENCER, R. J., CHESSON, A. (1994): The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 215-220. p.
- STANLEY, N. R., LAZAZZERA, B. A. (2004): Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52 (4) 917-924. p.
- STEEN, M. T., CHUNG, Y. J., HANSEN, J. N. (1991): Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4) 1181-1188. p.
- STEVENS, K. A., SHELDON, B. W., KLAPES, N. A., KLAENHAMMER, T. R. (1991): Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (12) 3613-3615. p.

- STONE, L. S., ZOTTOLA, E. A. (1985): Scanning electron microscopy of stainless-steel finishes used in food processing equipment. *Food Technology*, 39, 110, 112-114. p.
- SZAKÁLY, S. (2004): A probiotikumokkal kapcsolatos alapismeretek, 4-17. p. In: SZAKÁLY, S. (Szerk.): *Probiotikumok és humánegészség. Vissza a természethez!* Mosonmagyaróvár: Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet, 52 p.
- SZEKÉR, K., BECZNER, J., HALÁSZ, A., MAYER, Á., REZESSY-SZABÓ, J., GÁLFI, P. (2005): In vitro adhesion of lactic acid bacteria and bifidobacteria to Caco-2P and IEC-18 cells. *Acta Alimentaria*, 34 (1) 91.-99. p.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W. (1976): Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40 (3) 722-756. p.
- The Prokaryotes. (2005): Release 3.20 (12/31/2005). <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- TODORIKI, K., MUKAI, T., SATO, S., TOBA, T. (2001): Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 154-159. p.
- TUOMOLA, E. M. (NÉE LEHTO), SALMINEN, S. J. (1998): Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 45-51. p.
- TUOMOLA, E. M., OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S. J. (1999): Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 159-163. p.
- TUOMOLA, E., CRITTENDEN, R., PLAYNE, M., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. (2001): Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(suppl), 393S-398S. p.
- VALERO, M., LEONTIDIS, S., FERNÁNDEZ, P. S., MARTÍNEZ, A., SALMERÓN, M. C. (2000): Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C. *Food Microbiology*, 17, 605-612. p.
- VATANYOOPAISARN, S., NAZLI, A., DODD, C. E. R., REES, C. E. D., WAITES, W. M. (2000): Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2) 860-863. p.
- VELRAEDS, M. M. C., VAN DER MEI, H. C., REID, G., BUSSCHER, H., J. (1996): Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (6) 1958-1963. p.
- VENEMA, K., VENEMA, G., KOK, J. (1995): Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends in Microbiology*, 3 (8) 299-304. p.
- VESTERLUND, S., PALTTA, J., KARP, M., OUWEHAND, A. C. (2005): Measurement of bacterial adhesion – in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 225-233. p.
- WANDLING, L. R., SHELDON, B. W., FOEGEDING, P. M. (1999): Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. *Journal of Food Protection*, 62 (5) 492-498. p.
- WIRTANEN, G., ALANKO, T., MATTILA-SANDHOLM, T. (1996): Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5, 319-326. p.

- YANG, R., JOHNSON, M. C., RAY, B. (1992): Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (10) 3355-3359. p.
- YUKSEL, S., HANSEN, J. N. (2007): Transfer of nisin gene cluster from *Lactococcus lactis* ATCC 11454 into the chromosome of *Bacillus subtilis* 168. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (3) 640-649. p.
- ZÁRATE, G., MORATA DE AMBROSINI, V. I., PEREZ CHAIA, A., GONZÁLEZ, S. N. (2002): Adhesion of dairy propionibacteria to intestinal epithelial tissue in vitro and in vivo. *Journal of Food Protection*, 65 (3) 534-539. p.
- ZHAO, T., DOYLE, M. P., ZHAO, P. (2004): Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (7) 3996-4003. p.
- ZOETENDAL, E. G., AKKERMANS, A. D. L., DE VOS, W. M. (1998): Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3854-3859. p.
- ZOETENDAL, E. G., VAUGHAN, E. E., DE VOS, W. M. (2006): A microbial world within us. *Molecular Microbiology*, 59, 1639-1650. p.
- ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. (1994): Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, 23 (2) 125-148. p.

M.2. Receptek

Csicsókalé (7.5% szárazanyag tartalmú)

| | |
|--|------------------------|
| Csicsókasűrítmény (Dr. Fitokup Kft., Budapest) | 11,33 g |
| Fiziológiás sóoldat | 100 ml-re kiegészíteni |
| Sterilizés 121°C, 15 perc | |

Mowiol oldat

| | |
|---|-------|
| Glicerol, 87%-os (Reanal) | 6 g |
| Mowiol 4-88 polivinil-alkohol (Fluka, Buchs, Svájc) | 2,4 g |
| Desztillált víz | 6 ml |
| 0,2 M Tris puffer, pH 8,5 (Sigma-Aldrich) | 12 ml |

Összemérjük a glicerolt és a mowiolt és alaposan összekeverjük. Hozzáadjuk a desztillált vizet és 2 órán inkubáljuk szobahőmérsékleten. Ezután hozzáadjuk a Tris puffert és kevergetés mellett kb. 53°C-on inkubáljuk, amíg a mowiol teljesen feloldódik. Az oldatot centrifugálással (4000-5000 rpm, 20 perc) tisztítjuk.

Nizin törzsoldat (2 mg/ml)

| | |
|--------------------------|-------|
| Nizin készítmény (Fluka) | 0,8 g |
| 0,02 N steril sósav | 10 ml |

Peptonvíz

| | |
|-------------------------------|---------|
| Bakteriológiai pepton (Merck) | 1 g |
| NaCl | 9 g |
| Desztillált víz | 1000 ml |
| Sterilizés: 121°C, 15 perc. | |

PCB (Plate Count broth) tápleves (pH 7,3)

| | |
|-----------------------------|---------|
| Tripton (Merck) | 5 g |
| Élesztőkivonat (Merck) | 2,5 g |
| Glükóz | 1 g |
| Desztillált víz | 1000 ml |
| Sterilizés: 121°C, 15 perc. | |

Tej tápleves (pH 6,8)

| | |
|---------------------------|--------|
| Sovány tejpor | 10 g |
| Bakteriológiai pepton | 1 g |
| Krómkrezolbíbor, 0,2 %-os | 5 ml |
| Desztillált víz | 100 ml |

A kémcsövek aljára kisujjnyi CaCO₃-t teszünk és 121°C-on 15 percig sterilizzük. Erre 10 ml táplevest mérünk és 0,5 Bar nyomáson 15 percig sterilizzük.

TPY (Trypticase-Phytone-Yeast extract) tápleves (pH 6,8-7,0)

| | |
|--|---------|
| Trypticase pepton (BBL) | 10 g |
| Phytone peptone | 5 g |
| Glükóz | 5 g |
| Élesztőkivonat | 2,5 g |
| Tween 80 | 1 ml |
| Cisztein-HCl | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2 g |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,5 g |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,25 g |
| CaCl ₂ | 0,15 g |
| FeCl ₃ x 6 H ₂ O | 0,03 g |
| Desztillált víz | 1000 ml |

Sterilezés: 121°C, 15 perc.

TPY (Trypticase-Phytone-Yeast extract) agar (pH=6,8-7,0)

A táptalajt a fenti recept szerint készítjük, azzal a különbséggel, hogy a tápleveshez sterilizálás előtt 15 g agar-agart is adunk.

Tripszin oldat (pH 7,3)

| | |
|-------------------------------|----------|
| Tripszin-EDTA (Sigma-Aldrich) | 20 v/v % |
| PBS | 80 v/v % |

Véres agar (pH 7,3)

| | |
|-----------------------|---------|
| Húskivonat | 10 g |
| Bakteriológiai pepton | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar-agar | 15 g |
| Desztillált víz | 1000 ml |

Sterilezés: 121°C, 15 perc.

Ha a táptalaj kb. 45°C-ra hűlt, 70 ml defibrinált marhavért (7%) adunk a táptalajhoz aseptikus módon, ezt követően öntünk lemezeket.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Beczner Juditnak, hogy munkám során mind emberileg, mind szakmailag támogatott. Bízgatása átsegített az elem kerülő nehézségeken, tanácsai lendületet és kedvet adtak a folytatáshoz. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Kovács Etelka osztályvezetőmnek ösztönzéséért és tanácsaiért.

Köszönet illeti a KÉKI Mikrobiológiai Osztályának munkatársait munkám elkészítésében nyújtott segítségükért és tanácsaikért, valamint hogy családias, vidám környezetet teremtettek, amelyben öröm volt dolgozni.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Gálfi Péternek, a SZIE Állatorvostudományi Kara munkatársának, valamint Csibrikné Németh Edinának és Kun Szilárdnak a rengeteg segítségért, amelyet a bélhámsejteken végzett kísérletek során nyújtottak. Köszönöm Lang Zsolt segítségét, melyet a statisztikai kiértékelésben nyújtott.

Köszönettel tartozom angliai témavezetőmnek Dr. Christine E. R. Doddnak és a Marie Curie kutatási programnak, hogy 10 hónapot tölthettem a Nottighmai Egyetemen és elvégezhettem a biofilmképződés vizsgálatával kapcsolatos kísérleteket. Köszönet illeti továbbá angliai munkatársaimat és barátaimat, Dr. Sarah Cannellt, Rodrigo Novát és Dr. Carl R. Harringtont segítségükért és támogatásukért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönönni Családom támogatását és kitartó türelmét.