

Tejsavbaktérium-izolátumok egyes probiotikus tulajdonságainak *in vitro* vizsgálata

Kulcsszavak: probiotikum, tejsavbaktérium, antibiotikum-rezisztencia, antimikrobiális aktivitás

1. Összefoglalás

Antibiotikum-rezisztenciáért felelős géneket hordozó baktériumok nem használhatók fel élelmiszerek előállításához, ezért a probiotikus törzsek antibiotikum-rezisztencia profiljának feltárása, valamint az általuk termelt antimikrobiális anyagok megismerése elengedhetetlen a probiotikus törzsek szelektálása során. Vizsgálataink célja komplex *in vitro* tesztrendszer további elemeinek kidolgozása és értékelése volt, melyekkel gyorsan és hatékonyan lehet nagyszámú, feltételezetten probiotikus izolátumot szelektálni. Korábbi munkánk során erdélyi nyers juhtej-, aludttej- és juhsajt-mintákból izolált baktériumtörzseket (n=217) teszteltünk és összesen 6 db Gram-pozitív, nem hemolizáló, kataláz-negatív, jól aggregálódó, jó sav- és epesav-tűrő képességű törzsre csökkentettük a mintaszámot. Jelen munkánkban az előszelektált törzsek (n=6) antibiotikum-rezisztenciáját és antimikrobiális anyagok termelésére való képességét vizsgáltuk. Az izolátumok mikrobaellenes aktivitását agardiffúziós lyukteszttel derítettük fel. Azt tapasztaltuk, hogy az E15, E66, E173, E198 és E216 azonosítószámú törzsek gátolták a *Salmonella Enteridis* ATCC 13076 törzs szaporodását éppúgy, mint a kontroll törzs (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356). Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok korongdiffúziós teszttel történtek. A *Levilactobacillus brevis* és a *Lactiplantibacillus plantarum* fajba tartozó hat izolátumunk több antibiotikummal szemben is rezisztensnek bizonyult, ezért nem használhatóak fel probiotikus termékek előállításához. Megállapítottuk, hogy *in vitro* tesztrendszerünk alkalmas a nem biztonságos izolátumok hatékony kiszűrésére.

¹ Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft. (Hungarian Dairy Research Institute Ltd.)

² Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék (Széchenyi István University, Albert Casimir Faculty at Mosonmagyaróvár, Department of Food Science)

³ Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola (Széchenyi István University, Wittmann Antal Multidisciplinary Doctoral School in Plant, Animal, and Food Sciences)

2. Bevezetés

A probiotikumok életképes mikrobák – jellemzően, de nem kizárólag baktériumok –, amelyek kellően nagy mennyiségben alkalmazva jótékonyan hatnak az emberi vagy az állati szervezet egészségi állapotára [1, 2, 3, 4]. Pozitív élettani hatásaik egy része (pl. károsodott mikrobiota helyreállítása, patogének kompetitív kiszorítása, savak és rövid szénláncú zsírsavak termelése) széles körűen elterjedt a közismert és részletesen tanulmányozott probiotikus nemzetségekben, másik részük (pl. rákkeltő anyagok semlegesítése, a bél védőgátjának megerősítése) gyakori egy probiotikus faj törzseinek többségében (ún. fajszerű hatások), míg a jótétemények harmadik csoportja (pl. neurológiai, immunológiai és endokrinológiai hatások) ritkán és egy adott faj esetében csupán néhány törzsnél jelentkezik (ún. törzsszerű hatások) [2].

Világszerte nagyszámú baktériumtörzset izolálnak azzal a céllal, hogy kiemelkedő tulajdonságú, feltételezhetően probiotikus törzseket találjanak köztük. A drága és komplikált állatkísérleteket meg kell előznie egy *in vitro* vizsgálatokból álló preszelekciós rendszernek [5], mellyel gyorsan, egyszerűen és viszonylag olcsón kiválaszthatók azok a törzsek – akár több ezer izolátum közül is –, amelyek remélhetőleg probiotikusnak bizonyulnak a majdani *in vivo* kísérletekben [6, 7, 8].

Korábbi vizsgálataink során, Erdélyben előállított nyerstej-, aludttej-, valamint sajtminiókból izolált baktériumtörzseket (n=217) teszteltünk, és összesen 6 db Gram-pozitív, nem hemolizáló, kataláz-negatív, jól aggregálódó, jó sav- és epesav-tűrő törzset találtunk közöttük [9]. Egy, nem jól aggregálódó, gyengén sav- és epesav-tűrő izolátum (E10) tesztelését is célul tűztük ki. Jelen munkánkban az így előszelektált törzsek (n=6+1) antibiotikum-rezisztenciáját és antimikrobiális anyagok termelésére való képességét vizsgáltuk. Az antibiotikum-rezisztenciáért felelős géneket hordozó baktériumok nem használhatók fel élelmiszerek előállításához, ezért a probiotikus törzsek antibiotikum-rezisztencia profiljának feltárása, valamint az általuk termelt antimikrobiális anyagok megismerése elengedhetetlen a probiotikus törzsek szelektálása során [10].

Ilyen előzményeket követően, munkánk célja az *in vitro* tesztrendszer további elemeinek kidolgozása és értékelése volt, melynek keretében tehát a kiválasztott baktériumtörzsek antibiotikum-rezisztenciáját és antimikrobiális aktivitását vizsgáltuk és elvégeztük genotípusba sorolásukat is. Végül olyan probiotikus törzset szándékoztunk találni, amely antimikrobiális hatású anyagokat termel patogén mikroorganizmusokkal szemben, miközben nem rezisztens egyetlen antibiotikumra sem és genetikailag a *Lactobacillus* nemzetségbe, vagy annak valamelyik utódnemzetségébe tartozik [11].

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kísérletekbe bevont baktériumtörzsek

Ahogy azt az előzőekben említettük, korábbi munkánk [9] eredményei alapján, Erdélyben előállított nyers juhtej-, aludttej- és juhsajt-mintákból izolált 7 db baktériumtörzset vontunk be a vizsgálatokba. A kiválasztott törzsek RAPD-PCR módszerrel meghatározott egy-egy klóncsoportot képviseltek. Hat izolátum kiválóan teljesített a klasszikus mikrobiológiai tesztek (telepmorfológia, Gram-festés, kataláz-próba, hemolízis-vizsgálat), az autoaggregáció-vizsgálat, valamint a sav- és epesav-tűrés tesztek során, a hetediket (E10) pedig azért vontunk be további kísérleteinkbe, mert az előzetes eredmények alapján ez szerepelt leggyengébben az összes vizsgálatban. Szándékunk volt megállapítani, hogy a további tesztek során képes lesz-e jobb eredményeket elérni, vagy továbbra is minden fontos tulajdonságban jelentősen alulmúlja a többi törzset.

Az izolátumok tartósítása és tárolása glicerines törzsoldatban történt. 3 ml táplevesbe belemostunk egy kacsnyi, MRS-CC agar, ill. MRS pH 5,4 agar felületéről levett törzset, majd inkubáltuk a törzs igényeinek megfelelően. Krio (fagyasztó) csőbe adagoltunk 300 µl-t a felszaporított tenyészetből és 900 µl 60%-os glicerindatát adtunk hozzá, vortexeltük és cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk kb. 30 mp-ig. A tárolás -80 °C-on történt, ultramély-fagyasztóban. A törzsek felélesztése és tenyésztése az 1. táblázatban feltüntetett paraméterek szerint történt.

1. táblázat. A kísérletekbe bevont saját izolálású és kontroll baktériumtörzsek felélesztésének és fenntartásának körülményei

Törzs	Belső azonosító	T / H / I / K*
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> NBRC 15906**	E10	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E15	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E66	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E92	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E173	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E198	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149**	E216	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN

Törzs	Belső azonosító	T / H / I / K*
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	B1	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	B4	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	B10	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	B40	CASO / 37 ± 1 / 24 / A
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 49775	B41	CASO / 37 ± 1 / 24 / A
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis ATCC 13076	B51	CASO / 37 ± 1 / 24 / A

*T: fenntartó tápközeg, H: tenyésztési hőfok (°C), I: tenyésztési idő (óra), K: tenyésztési körülmény (A: aerob, AN: anaerob).
 **Saját izolátumainkról a vizsgálatok végén, a genetikai azonosítás eredményeként derült ki, hogy mely fajba tartozó törzsek.

3.2. A szelektív tenyésztés körülményei, tápközegei és elkészítésük

3.2.1. Fiziológias sóoldat

A decimális hígítási sor előállításához használt hígítófolyadékhoz 8,5 g NaCl-ot mértünk be, majd 1 L desztillált vízben feloldottuk. Sterilizését autoklávban, 121 °C-on, 15 percig végeztük. A kazein-peptonos sóoldat hasonló módon készült, kiegészítve 1 g tripton (kazein-pepton) hozzáadásával.

3.2.2. Foszfát-puffer (PBS) oldat

Kereskedelmi forgalomból beszerzett 1 × PBS oldattal dolgoztunk (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország), amelyet felhasználás előtt 121 °C-on, 15 percen át steriliztünk.

3.2.3. De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar és leves (pH=6,2)

A kereskedelmi forgalomban kapható MRS agart és levest (Oxoid, Basingstoke, Egyesült Királyság) a gyártó utasításai szerint készítettük el. Az ajánlott mennyiségeket (62 g, ill. 52 g) analitikai pontossággal bemértük, majd 1-1 L desztillált vízben feloldottuk. Fűthető mágneses keverővel segítettük a komponensek oldódását, ezt követően pedig autoklávban steriliztük a tápközegeket (121 °C-on, 15 percig). A pH-értéket (6,2) sterilizést követően ellenőriztük.

3.2.4. M17 agar és leves (Terzaghi szerint)

A gyártó (Biokar Diagnostics, Allonnen, Franciaország) utasításait követve, analitikai mérleggel 57,2 g-ot mértünk be a dehidratált M17 agarból, ill. 42,2 g-ot a levestől, majd 1000-1000 ml desztillált vízben feloldottuk őket. A komponensek teljes oldódásáig melegítettük a tápközegeket, majd hóálló üvegekbe adagoltuk és autoklávban, 121 °C-on, 20 percig steriliztük.

3.2.5. CASO agar és leves

A CASO agart és a CASO levest szintén a gyártó (Biolab) utasításai alapján készítettük el. 45 g, ill., 36 g mennyiségeket 1-1 L vízben oldottunk fel. Az oldódást követően standard paraméterek (121 °C, 15 perc) mellett, autoklávban hajtottuk végre a sterilizést.

3.2.6. Anaerob tenyésztés

Az anaerob körülményeket a következőképpen biztosítottuk a vizsgálatok során: AnaeroPack Rectangular tégelyben (Merck, Darmstadt, Németország), GENbox anaerob só (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Franciaország) hozzáadásával inkubáltuk az agarlemezeket. Az anaerob körülmények fennállásáról a Microbiologic Aerotest indikátor (Merck) fehérről kék színre való változása adott tájékoztatást.

3.3. Antimikrobiális aktivitás vizsgálata

3.3.1. A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

3.3.1.1. CASO agar

Elkészítése a 3.2.5. alfejezetben leírtak szerint történt.

3.3.1.2. Afilact® Fluid lizozim enzim

A Chr. Hansen cég (Hørsholm, Dánia) által előállított konzerválószer aktív összetevője a lizozim, amely számos Gram-pozitív baktérium szaporodását gátolja. A lizozim több mint 30 országban engedélyezett komponens az élelmiszerekben. A termék tojásfehérjéből kivont enzimet tartalmaz (E1105), az EU-ban korlátozottan használható sajtok tartósításához.

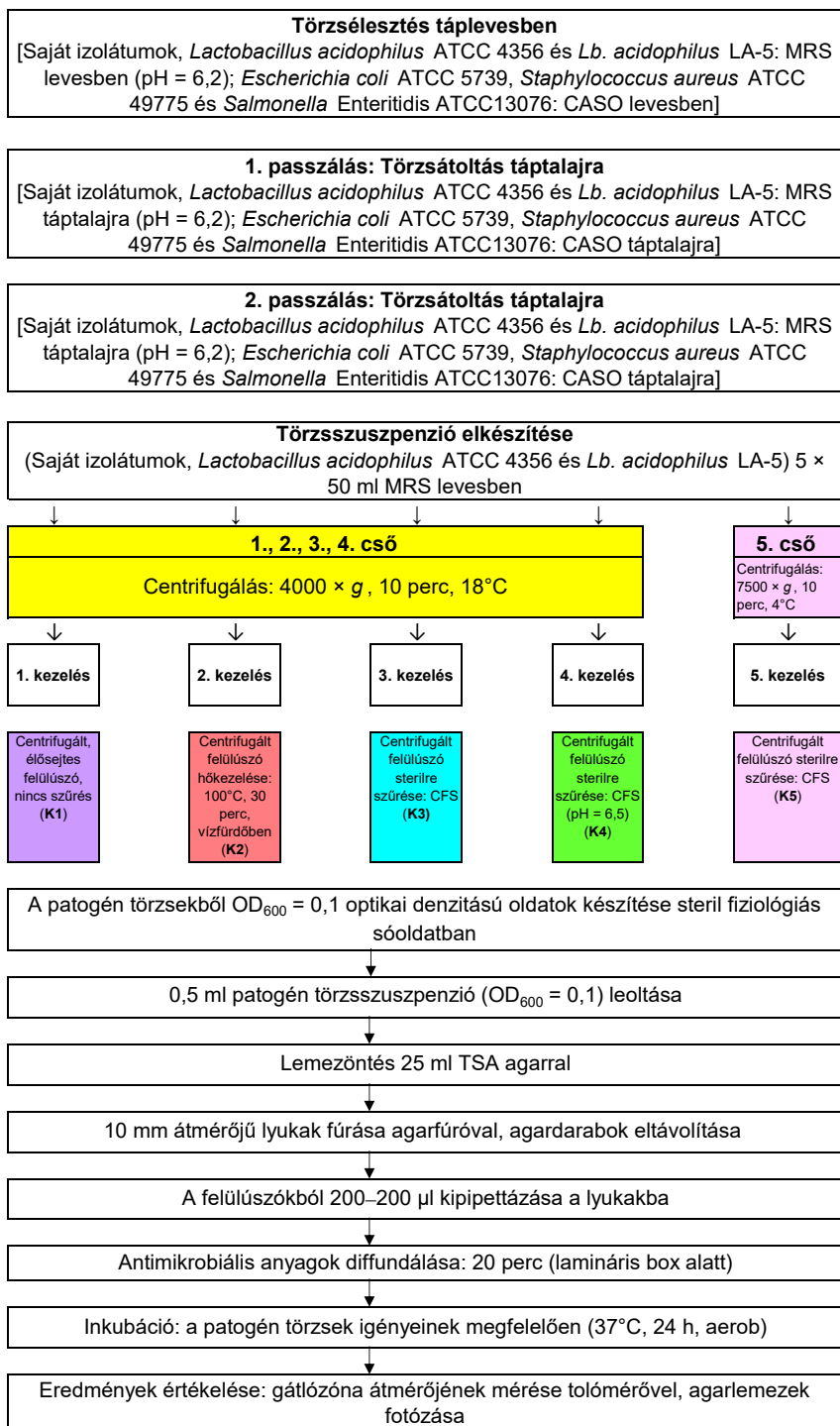
3.3.1.3. Flóraszcept

A Flóraszcept (Unilever, Budapest, Magyarország) fertőtlenítő hatású tisztítószer. Fő hatóanyaga a nátrium-hipoklorit, mely hatékony a baktériumok és a gombák ellen is. A terméket hígítatlan formában használtuk fel vizsgálatainkban.

3.3.2. Agardiffúziós lyukteszt

3.3.2.1. Patogén baktériumok szuszpenzióinak (inokulum) elkészítése

A törzseket felélesztettük, majd kétszer passzáltuk. A második passzálás utáni friss, 24 órás tenyészeteket használtuk fel a szuszpenziók előállításához. A táptalajon kinőtt telepekre 10 ml steril desztillált vizet pipettáztuk, majd óvatosan, lapos végű szélesztőpálca segítségével fellazítottuk a telepeket az agar felületéről. Ezután a szuszpenziókat átpipettáztuk a Petri-csészékből műanyag Falcon-csővekbe. A kívánt sejttűrűségeket az optikai denzitás elve alapján állítottuk be úgy, hogy 600 nm-es hullámhosszon mértünk BioMate 160 UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA), ezután pedig az értékeket standardizáltuk, 0,1-re állítottuk minden egyes mintánál, hogy a mérési eredmények összehasonlíthatóak legyenek.



1. ábra. Az antimikrobiális aktivitás vizsgálatának folyamata

3.3.2.2. Agarlemezek elkészítése

Az előzőekben leírtak szerint előkészített baktériumszuszpenziókból 0,5-0,5 ml-t pipettáztunk a steril Petri-csészékbe, majd 45 °C-ra lehűtött CASO táptalajjal lemezeket öntöttünk. A tesztmikrobák táptalajbéli egyenletes eloszlása érdekében óvatos, körkörös, rotáló mozdulatokat hajtottunk végre a lemezöntést követően. A táptalaj megszilárdulása után, lelángolt és lehűtött steril agarfúróval lemezenként 4-4 db, 10 mm átmérőjű lyukat vágtunk az agarba. Az így kiszűrt agarkorongokat steril, egyszerhasználatos műanyaglándszával távolítottuk el a lemezekből.

3.3.2.3. Saját izolátumok felülűszóinak kezelése

A négy lyuk közül az elsőbe 200 µl steril fiziológiás sóoldatot pipettáztunk. Ez töltötte be a kontroll szerepét, hiszen a baktérium szaporodását nem gátolta, ugyanakkor jelezte, hogy a törzs életképes állapotban volt a kísérlet során. A másik három lyukba az izolátumok felülűszójának valamelyik kezelt változatából került 200-200 µl, ezzel megvalósult egy lemezen a három technikai ismétlés. Ezt követően a patogén baktérium igényeinek megfelelően inkubáltuk a lemezeket.

A vizsgálandó izolátumok felülűszóit öt eltérő kezelésnek vetettük alá. A lépések eleje megegyezett: minden törzsnél 5-5 db Falcon-csőbe mértünk 45 ml táplevest (MRS leves – De Man, Rogosa, Sharpe broth) és ebben élesztettük fel a törzseket, a számukra megfelelő körülmények biztosítva (37 °C, 24 h, anaerob közeg). Az inkubálás letelte után a mintaelőkészítések eltérőek voltak, ezeket az **1. ábrán** részletezzük.

1. kezelés: Az inkubálás után az összes törzsünk első számú Falcon-csővét 4000 g-n, 10 percen keresztül, 18 °C hőmérsékleten centrifugáltuk (Eppendorf Centrifuge 5804 R). A táplevest ezután leöntöttük róla és 1 × PBS oldatból 42 ml-t mértünk a cső aljában lévő pelletre, majd 10 mp-en keresztül vortexeltük. Ismételt centrifugálás után a felülűszót 50 ml-es, steril Falcon-csőbe öntöttük át.
2. kezelés: A lépések megegyeztek az 1. kezelés lépéseivel, de a második számú Falcon-csövek tartalmának steril Falcon-csőbe történő átöntése után ezeket a felülűszókat hőkezeltük (100 °C-os vízfürdőben, 30 percig).kezelés: A lépések megegyeztek az 1. kezelés lépéseivel, de a harmadik számú Falcon-csövek mintáinak esetében a második centrifugálás után a felülűszókat vizeletgyűjtő műanyagpohárba öntöttük, amiből 0,2 µm-es pórusátmérőjű membránszűrőn keresztül új, 50 ml-es, steril Falcon-csőbe átszűrtük.
3. kezelés: A négyes számú Falcon-csövekről egyszeri centrifugálás (4000 g, 10 perc, 18 °C) után a táplevest leöntöttük új, steril Falcon-csövekbe. Ezt követően a felülűszó (táplevest is tartalmazta) pH-értékét beállítottuk 6,5-re. A kívánt érték eléréséhez 1 M NaOH-ot használtunk, a pH-értéket pedig FiveEasy F20 típusú pH-mérővel (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) ellenőriztük. Az érték beállta után a felülűszót 0,2 µm-es pórusátmérőjű membránszűrőn keresztül új, 50 ml-es steril Falcon-csőbe átszűrtük.
4. kezelés: Az ötös számú Falcon-csövek centrifugálásához az előző kezeléseketől eltérő paramétereket alkalmaztunk. A mintákat 10 percen keresztül 7500 g-n és 4 °C-on centrifugáltuk, majd itt is leöntöttük a táplevest és 42 ml-nyi 1 × PBS oldattal töltöttük fel. Ismét centrifugáltunk a módosított beállítások szerint. Ezt követően a felülűszót vizeletgyűjtő műanyagpohárba öntöttük, amiből 0,2 µl-es pórusátmérőjű membránszűrőn keresztül új, 50 ml-es steril Falcon-csőbe átszűrtük.

3.3.2.4. Inkubálás és a gátlási zónák meghatározása

Az elkészített lemezeket 20 perces diffundálási idő után termosztátba helyeztük, ahol a patogén baktériumok igényei szerint történt az inkubálás, majd értékeltük az eredményeket. A gátlózóna átmérőjét tolmérővel határoztuk meg. Minden egyes vizsgálatot 2–2 db párhuzamos lemezzel végeztünk el. Kétféle kimenetelt tapasztaltunk: a felülűszót tartalmazó lyuk körül gátlási zóna alakult ki, vagy a lyuk körül nem volt látható eltérés. Utóbbi azt jelentette, hogy a baktérium-felülűszó nem gátolta, de nem is serkentette az adott baktérium szaporodását.

3.4. Antibiotikum-rezisztencia vizsgálat

3.4.1. A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

3.4.1.1. De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar (pH = 6,2)

Elkészítése a 3.2.3. alfejezetben leírtak szerint történt.

3.4.1.2. Iso-Sensitest agar

A gyártó (Oxoid) által javasolt 31,4 g mennyiséget analitikai mérlegen bemértük és 1 L vízben feloldottuk. A komponensek teljes oldódását követően, 121 °C-on, 15 percig sterilizáltuk a táptalajokat.

3.4.1.3. *Lactobacillus* Susceptibility Medium (LSM)

Az LSM táptalaj elkészítéséhez szükség volt MRS (Oxoid) és Iso-Sensitest (Oxoid) táplevesekre. Ezekből a

következésképpen állítottuk elő az LSM táptalajt: összemértünk 900 ml Iso-Sensitest levest és 100 ml MRS levest, melyet 15 g agar-aggarral egészítettünk ki. A sterilizést standard paraméterek mellett (121 °C, 15 perc) végeztük.

3.4.1.4. Rezisztencia korongok

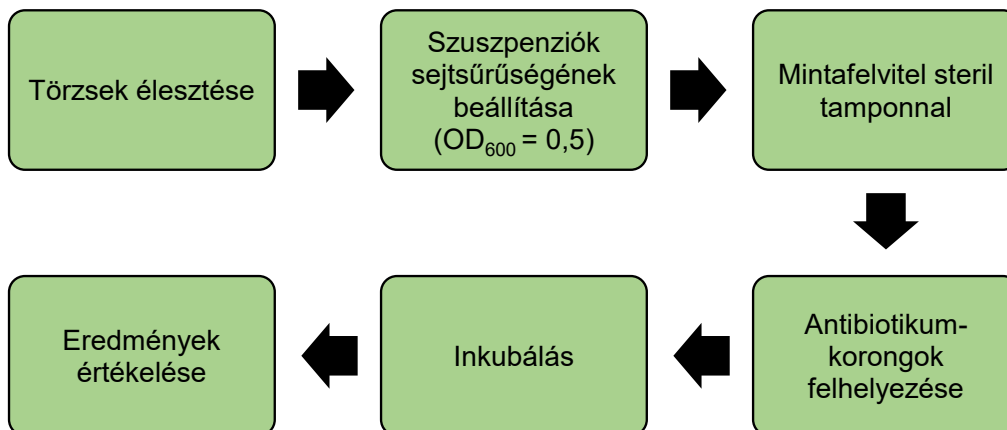
Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatainkban felhasznált érzékenységi korongok (Biolab) jellemzőit a **2. táblázat**ban foglaltuk össze.

2. táblázat. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatokhoz használt érzékenységi korongok hatóanyag-koncentrációi

Antibiotikum neve	Hatóanyag-koncentráció (µg)	Rövidítés
Ampicillin	10	AM10
Kloramfenikol	30	C30
Klindamicin	2	DA2
Eritromicin	15	E15
Gentamicin	10	CN10
Kanamycin	30	K30
Nalidixsav	30	NA30
Sztreptomycin	10	S10
Tetraciklin	30	TE30
Trimetoprim + Szulfametoxazol	1,25 + 23,75	SXT25
Vankomicin	30	VA30

3.4.2. Antibiotikum-rezisztencia vizsgálatának folyamata

A **2. ábrán** láthatók az elvégzett antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok lépései.



2. ábra. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálat sémája

MRS táptalajon fellesztettük a baktériumtörzseinket, majd a számukra optimális körülmények biztosítása mellett inkubáltuk őket. Ezután egy szoliter telepet átoltottunk egy újabb MRS táptalaj felszínére, hogy biztosan egy telepből induljunk ki és ne kevert tenyésztettel dolgozzunk. 24 óra elteltével a felnövekedett telepekre 10 ml desztillált vizet pipettáztunk és feloldottuk benne a telepeket, figyelve arra, hogy a táptalajt ne keverjük bele a szuszpenzióba. Az oldatot a Petri-csésze tetejéről Falcon-csőbe pipettáztuk át. Ezt követően a sejtsuszpenziók sűrűségét $OD_{600} = 0,5$ értékre állítottuk be BioMate 160 UV-Vis spektrofotométerrel. Minden egyes hígításnál visszaellenőriztük, hogy megfelelőek voltak-e a számításaink. Ezután steril tamponos mintavevő-pálcákkal vittük fel a sejtsuszpenziókat a táptalajok (MRS agar, ISO-Sensitest agar, LSM agar) felszínére oly módon, hogy a táptalaj teljes felületét borítsa a felvitt mintamennyiség. 15 percen keresztül állni hagytuk a Petri-csészéket, hogy a mikrobák alkalmazkodhassanak a körülményekhez. Mindezek után, kézi adagolóval felhelyeztünk Petri-csészénként 6 db antibiotikum-rezisztencia korongot (köztük 1 db üres korongot) és megfelelő körülményeket biztosítva inkubáltuk a lemezeket (37 °C, 24 h, anaerob viszonyok). Egy nap elteltével a lemezeken kialakult gátlózónákat tolómérővel megmértük. A gátlózónák méretéből mindig levontunk a korong átmérőjét (6 mm).

3.5. Genetikai azonosítás

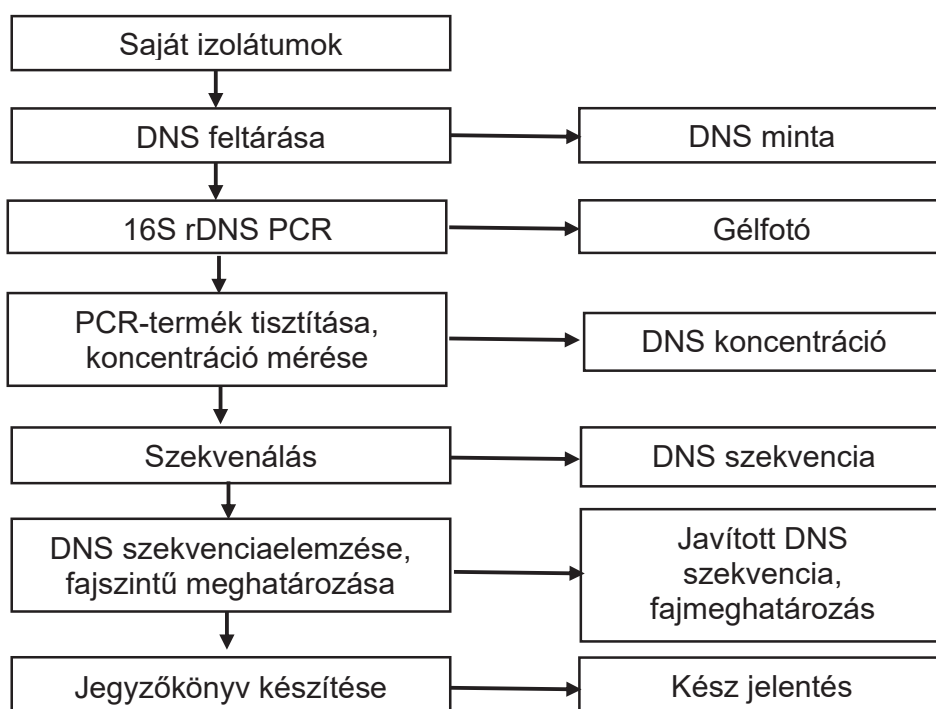
3.5.1. Felhasznált anyagok és eszközök

A genetikai azonosításhoz szükséges anyagok, ill. eszközök köre az alábbiakban összegezhető:

- Baktérium-tisztatényészetek táptalajok felületén
- NucleoSpin Microbial DNA izoláló egységcsomag (Macherey-Nagel kit)
- DreamTaq Green PCR Master Mix 2x
- 27f és 1492r primerek
- Agarózgél
- EcoSafe gélfesték
- Gene Ruler 1kb plus DNA ladder
- GeneJet PCR purification kit (Thermo Fisher)

3.5.2. Azonosítás folyamata

A genetikai azonosítás lépései az **3. ábrán** láthatók.



3. ábra. A genetikai azonosítás lépései és az egyes lépések eredménye

A hét lépésből álló vizsgálati módszert a következőképpen hajtottuk végre: (1) genomi DNS feltárása; (2) 16S rDNS PCR futtatás; (3) agaróz gélelektroforézis; (4) gélfotó kiértékelése; (5) PCR termék tisztítása, DNS koncentráció és tisztaság meghatározása; (6) DNS nukleotid-sorrend meghatározása (szekvenálás); (7) szekvenciaelemzés, kiértékelés.

3.5.2.1. Genomi DNS feltárása

A baktériumtörzseket a glicerines stockból ritkító szélesztéssel felvittük MRS táptalaj felületére, majd egy éjszakán keresztül, 37 °C-on, anaerob körülmények között inkubáltuk. Ezt követően szoliter telepeket passzáltunk MRS táptalajra és megismételtük az inkubálást. A genomi DNS-tisztításhoz szükséges önálló telepeket 1,5 ml fiziológiás sóoldattal töltött Eppendorf csövekbe mostuk. A genomi DNS-tisztítás NucleoSpin Microbial DNA csomaggal (Macherey-Nagel, Düren, Németország) történt, a gyártó által megadott protokoll alapján [12].

3.5.2.2. 16S rDNS PCR futtatás

A kinyert DNS minták meglétéről polimeráz-lánreakcióval győződünk meg. Ehhez 1,5 ml-es Safe Seal Eppendorf-csőbe reakcióelegyet mértük össze az alábbi anyagokból: DreamTaq Green PCR Master Mix (2x), 27f és 1492r primerek, molekuláris biológiai tisztaságú AccuGENE víz (Lonza, Basel, Svájc) és a saját izolátumok tisztított DNS-e. A vizsgálatot Mastercycler PCR (Eppendorf, Hamburg, Németország) géppel végeztük, amelyen a 16S rDNS programot futtatuk. Ennek beállításai a **3. táblázatban** láthatóak.

3. táblázat. A 16S rDNS program egyes ciklusainak paramétereit

Lépés	Folyamat neve	Hőmérséklet (°C)	Idő
1.	Felmelegítés	95	4 min
2.	Denaturáció	95	20 sec
3.	Primerek bekötődése	54	30 sec
4.	Lánchosszabbítás	72	1 min
5.	Elongáció	72	5 min
6.	Hőntartás	10	∞

*A 2-4. lépés összesen 40-szer játszódott le.

3.5.2.3. Agaróz gélelektroforézis

A program lejárta után, a felsokszorozott DNS-molekulák láthatóvá tételéhez agaróz gélelektroforézis technikát alkalmaztunk. Az 1%-os agarózgél elkészítéséhez 0,6 g agarózt (VWR) 60 ml 1 × TBE (tris-bórecetsav) oldatban kellett feloldanunk. Ezt követően forraltuk az elegyet az agar teljes feloldódásáig. A forralás utáni hűtés alatt mágneses keverővel kevertettük az oldatot és 6 µl DNS ECO Safe festékkoldatot (Pacific Image Electronics, Torrance, CA, USA) adtunk hozzá. A géllöntés során géltálcát és gélfésűt használtunk. Az agaróz megdermedése után a gélfésűt a gélből eltávolítottuk, a géllal töltött tálcát pedig az elektroforézis tankba helyeztük, amit pufferrel töltöttünk fel (1 × TBE oldat). A PCR reakció termékeit felvittük a zsebekbe és elkezdtük az elválasztást.

3.5.2.4. Gélfotó kiértékelése

A gélelektroforézis lefutását követően meggyőződünk róla, hogy minden minta terméke tartalmaz DNS-t. Ebben segítséget jelentett, hogy az elválasztás megkezdése előtt, a mintákkal együtt, molekulásúly markert adagoltunk a gélbe.

3.5.2.5. PCR termék tisztítása, DNS koncentráció és tisztaság meghatározása

Az egyes termékek DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher) mértük meg, majd egy külső céghez (MacroGen Europe, Amszterdam, Hollandia) küldtük szekvenáltatni a mintákat.

3.5.2.6. DNS nukleotidsorrend meghatározása (szekvenálás)

A munkafolyamatnak csak bizonyos részei történtek mosonmagyaróvári laboratóriumunkban. Ilyen volt a minták előkészítése, elküldése szekvenáltatásra, majd az eredmények kiértékelése. Az azonosítandó DNS mintákat 1,5 ml-es Eppendorf-csövekbe adagoltuk, majd azonosítószámmal ellátott matricákkal felcímkéztük, melyekre ráírtuk a primer nevét (27f, 1492r). A DNS szakaszok bázissorrendjét a forward és a reverse primerekkel is meghatároztuk, ezért minden DNS mintát kétfelé kellett szétmérni (5–10 µl). A szekvenáláshoz szükséges primereket is kiadagoltuk, szintén jelölve és feliratozva a reakciócsöveket. Miután minden csövet lezártunk, parafilmmel leragasztottuk azokat és elpostáztuk a szolgáltató cégnek (MacroGen Europe).

3.5.2.7. DNS szekvenciák elemzése és kiértékelése

A DNS-ek nukleotidsorrendjét a szolgáltató cég e-mailben küldte meg. A közölt linkről lehetett letölteni az állományokat. A fájlok kezeléséhez a Chromas és a ChromasPro programokat (Technelysium, Brisbane, Ausztrália) használtuk. A forward és a reverse primerekkel kapott szekvenciákat egymásba illesztettük, majd a kapott szekvencia elejéről és végéről az értékelhetetlen bázisokat trimmeltük. Ahol a két szekvencia eltért egymástól, ott a kromatogram által felajánlott javítást alkalmaztuk. Ezt követően a javított szekvencia innen kimásolható nukleotidsorrendjét a Basic Local Alignment Search Tool online weboldalán a “nucleotid blast” opcióval értékeltük [13].

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Antimikrobiális aktivitás vizsgálata

Izolátumaink mikrobaellenes hatásának megállapítása céljából végzett vizsgálatok eredményei a **4. táblázat**-ban láthatók.

4. táblázat. Az antimikrobiális aktivitás vizsgálatának eredményei (a gátlózónák értékei mm-ben megadva)

Gátló ágens	Kezelés**	Gátolandó patogén baktérium		
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 49775	<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076
Flóraszept	Hígítatlan	8	14	9,0
Afilact Fluid	Hígítatlan	0	8	0,0
E10 izolátum	K1	0	0	0,0
	K2	0	0	0,0
	K3	0	0	0,0
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	0,0
E15 izolátum	K1	0	0	15,3
	K2	0	0	14,2
	K3	0	0	16,5
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	10,9
E66 izolátum	K1	0	0	7,3
	K2	0	0	13,8
	K3	0	0	13,7
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	11,7
E92 izolátum	K1	0	0	0,0
	K2	0	0	11,7
	K3	0	0	8,0
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	13,0
E173 izolátum	K1	0	0	20,8
	K2	0	0	22,3
	K3	0	0	17,5
	K4	0	0	5,8
	K5	0	0	20,5
E198 izolátum	K1	0	0	13,0
	K2	0	0	13,8
	K3	0	0	9,3
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	12,2
E216 izolátum	K1	0	0	16,0
	K2	0	0	15,0
	K3	0	0	15,0
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	18,0

* A mm-ben feltüntetett eredmények 9 technikai × 2 biológiai ismétlés átlagértékei.

** A kezelések részletes leírását a 3.3.2.3. alfejezet tartalmazza.

ATCC: American Type Culture Collection (egy amerikai, szabványos mikroorganizmus-referencia törzseket szolgáltató nonprofit szervezet. A szerk.)

A pozitív kontroll szerepét betöltő Flóraszept mindhárom patogén baktériumtörzs élettevékenységét gátolta, míg az Afilact Fluid lizozim enzim – az előzetes várákozásoknak megfelelően – csak a Gram-pozitív *Staph. aureus* törzs szaporodását akadályozta meg (**4. táblázat**).

Az E10-es izolátumunk semelyik kezelésének nem volt gátló hatása a tesztelt patogén baktériumokra. Ehhez képest, Miao és munkatársai [14] arról számoltak be, hogy a tibeti kefirből izolált *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 ún. F1 bakteriocint termel, mely széles antimikrobiális spektrummal rendelkezik. A bakteriocin hőállóan bizonyult és nem változott a természete 3,0-as, 6,0-os és 9,0-es pH-értékű közegekben sem. A nevezett szerzők összesen 49 db tejsavbaktérium-törzset izoláltak, melyeket sterilizett tejben tenyésztettek és a sejtmentes felülűszójuk antimikrobiális aktivitását vizsgálták agardiffúziós lyuktesztek segítségével. Hét törzs sejtmentes felülűszója fejtett ki gátló hatást *Escherichia colira*. Az egyes törzsek sejtmentes felülűszói az indikátor *E. coli*-val szemben 10,9±0,1 mm, valamint 12,0±0,4 mm nagyságú gátlózónát képeztek. Az E10-es izolátumunk sejtmentes felülűszójának kinyerése nem tejből történt, hanem 6,2-es pH-értékű MRS levesből, és ez okozhatta a két vizsgálat eredménye közti eltérést.

Az E15-ös törzs élősejtes tenyészet 15,3 mm átmérőjű gátlózónát produkált *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 esetében. Azt tapasztaltuk, hogy a holt sejtek is képesek voltak gátolni, ugyanis a 100 °C-os, 30 percig tartó hőkezelés ellenére az E15-ös törzs 14,2 mm-es gátlást fejtett ki a *Salm.* Enteritidis-re. A 6,5-es pH-értékre beállított közeg viszont nem tette lehetővé a nevezett kórokozó gátlását, amiből arra következtethetünk, hogy az E15-ös törzs savtermészetű antimikrobiális hatású anyagot termel. 7500 g-n végrehajtott centrifugálás hatására nem sikerült több antimikrobiális anyagot kinyerni és nagyobb gátlózónát produkálni.

Az E66-os törzs élő tenyészet (K1 kezelés) csupán 7,3 mm-es gátlózónát alakított ki, míg a K2 és a K3 kezelés fejtette ki a legnagyobb mértékű gátlóhatást a tesztelt *Salmonella* tenysézzel szemben. A közel semleges pH-értékű CFS-nek (K4) nem volt semmilyen kimutatható hatása egyik patogén törzsre sem. Az intenzív K5 kezelés nem segítette elő nagyobb átmérőjű gátlózóna kialakulását.

Az E92-es törzs élő tenyészetének és semlegesített sejtmentes felülűszójának sem volt kimutatható gátlóhatása a tesztelt patogén baktériumokra. Leghatékonyabbnak a K5 kezelés bizonyult, amit a 13,0 mm-es gátlózóna bizonyított.

Az E173-as törzsnek mind az ötféle kezelése gátolta a *Salm.* Enteritidis szaporodását. A leghatékonyabb a hőpusztításon alapuló K2-es kezelés volt (22,3 mm-es gátlózóna). A törzs 6,5-es pH-értékre beállított sejtmentes felülűszója kismértékű, 5,8 mm-es gátlást fejtett ki a *Salm.* Enteritidis-re. Ez azt bizonyítja, hogy az E173-as törzs nem kizárólag savas természetű antimikrobiális anyagokat termel.

Az E198-as törzs hővel előlt tenyészet 13,8 mm-es, míg az élő tenyészet 13,0 mm-es gátlózónát alakított ki a *Salm.* Enteritidis-szel beoltott agarlemezen. A K4 kezelésnek egyik patogén törzsre sem volt érzékelhető hatása.

Az E216-os törzs K1 és K5 kezelése (16,0 mm, ill. 18,0 mm) – ellentétben a K4 kezeléssel – kifejezetten hatékonyan bizonyult a szalmonellózis kórokozójával szemben.

Összességében megállapítottuk, hogy egyik tesztelt izolátumunknak sem volt kimutatható hatása az *E. coli* és a *Staphylococcus aureus* vizsgált törzseire. Eredményeink hasonlóak Maragkoudakis és munkatársai [15] eredményeihez, akik nyerstejből *Lb. acidophilus* ACA-DC 295, Cheddar sajtból *Lcb. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 3345, Kasserli sajtból *Lcb. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4038, valamint Feta sajt sólevéből *Lactiplantibacillus plantarum* ACA-DC 146 törzseket izoláltak és azok antimikrobiális aktivitását tesztelték agardiffúziós lyuktesztekkel. Megállapították, hogy a 29 db tejsavbaktérium izolátum sejtmentes felülűszójának egyike sem gátolta a patogén *E. coli*, a *Salm.* Typhimurium és a *Helicobacter pylori* törzseinek szaporodását.

4.2. Antibiotikum-rezisztencia vizsgálat

A standardizált antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok során felmerült, hogy a tejsavbaktériumok tenyésztéséhez általánosan használt MRS tápközeg antagonistá hatást fejthet ki az egyes antibiotikumokkal szemben. A gátlóhatások kiküszöbölésének érdekében fejlesztették ki az LSM tápközeg, amely 90%-ban Iso-Sensitest agarból és 10%-ban MRS agarból áll. Az LSM táptalaj (Lipase Salt Mannitol közeg) – a vonatkozó nemzetközi szabvány [16] ajánlásainak megfelelően – bizonyítottan elősegíti a laktobacillusok és a bifidobaktériumok szaporodását, miközben minimalizálja a potenciális antagonizmust a tápközeg komponensei és a tesztelt antimikrobiális szerek között [17]. Vizsgálataink eredményei az **5. táblázat**ban láthatók.

Mind a *Lb. acidophilus* ATCC 4356, mind az előszelektált izolátumaink rezisztensnek bizonyultak vankomicinre és nalidixsavra, amire magyarázatul szolgál Charteris és munkatársainak [18] közlése, miszerint a *Lactobacillus* fajok eredendően nalidixsav-rezisztensek. Wolupeck és munkatársai [19] *Lactobacillus* törzsek antibiotikum-rezisztenciáját tanulmányozva azt tapasztalták, hogy az összes törzsük rezisztens ciprofloxacinnra, gentamicinre, sztreptomycinre és vankomicinre, ugyanakkor viszont érzékeny tetraciklinre, valamint kloramfenikolra. A mi izolátumaink – és a *Lb. acidophilus* ATCC 4356 is – hasonlóképpen érzékenynek mutatkoztak az utóbbi két antibiotikumra.

Említést érdemel, hogy a *Lb. acidophilus* ATCC 4356 nem szaporodott Iso-Sensitest táptalajon, a vizsgálat eredménye ezért értékelhetetlennek bizonyult (**5. táblázat**). Huys és munkatársai [17] szintén arra a következtetésre jutottak, hogy az Iso-Sensitest tápközeg általánosságban nem ajánlható tejsavbaktériumok antibiotikum-érzékenységének tesztelésére.

5. táblázat. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok eredményei (a gátlási zónák értékei mm-ben értendők)*

Törzs	Táptalaj	Üres korong	Antibiotikum**										
			CN10	C30	VA30	S10	E15	DA2	AM10	TE30	K30	NA30	SXT25
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Iso-Sensitest		Nem értékelhető										
	MRS	0,0	0,0	25,2 ± 1,6	0,0	8,7 ± 2,3	23,5 ± 0,8	0,0	9,0 ± 3,5	21,0 ± 7,0	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	11,5 ± 4,6	23,8 ± 1,5	0,0	10,2 ± 4,7	25,5 ± 2,9	0,0	0,0	18,8 ± 6,9	0,0	0,0	0,0
E10 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	17,0 ± 2,2	20,0 ± 2,3	0,0	13,2 ± 2,7	29,5 ± 3,5	7,7 ± 0,8	0,0	26,7 ± 4,6	2,5 ± 2,1	0,0	4,7 ± 2,7
	MRS	0,0	0,0	25,5 ± 2,1	0,0	0,0	21,2 ± 4,6	11,0 ± 7,6	5,7 ± 1,0	20,3 ± 4,1	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	12,1 ± 2,8	23,0 ± 0,6	0,0	7,2 ± 2,8	22,3 ± 5,6	12,3 ± 4,5	0,0	21,0 ± 1,9	0,0	0,0	5,5 ± 3,2
E15 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	17,2 ± 4,1	24,2 ± 4,9	0,0	12,2 ± 0,8	25,2 ± 2,6	0,0	0,0	10,8 ± 2,0	8,5 ± 2,4	0,0	17,0 ± 2,4
	MRS	0,0	2,7 ± 0,5	25,0 ± 0,9	0,0	0,0	20,3 ± 1,9	0,0	0,0	12,5 ± 2,6	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	14,3 ± 0,5	23,5 ± 2,3	0,0	3,0 ± 0,9	21,8 ± 2,3	0,0	0,0	10,0 ± 2,0	0,0	0,0	22,7 ± 1,2
E66 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	18,7 ± 0,8	21,2 ± 2,9	0,0	11,7 ± 0,5	25,3 ± 0,8	0,0	0,0	10,8 ± 2,0	8,8 ± 2,1	0,0	16,0 ± 1,3
	MRS	0,0	2,0 ± 0,9	25,2 ± 1,6	0,0	0,0	22,2 ± 1,6	0,0	5,7 ± 1,2	14,3 ± 0,8	2,3 ± 0,5	0,0	0,0
	LSM	0,0	14,5 ± 1,5	21,8 ± 3,4	0,0	4,3 ± 2,1	22,2 ± 1,5	0,0	0,0	12,7 ± 0,8	2,5 ± 1,0	0,0	22,7 ± 1,2
E92 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	17,1 ± 2,7	19,4 ± 3,8	0,0	8,6 ± 2,7	18,2 ± 4,6	0,0	8,6 ± 4,0	8,3 ± 1,7	6,0 ± 1,9	0,0	14,3 ± 3,3
	MRS	0,0	7,3 ± 1,0	21,4 ± 2,2	0,0	1,0 ± 0,1	17,6 ± 1,9	0,0	10,2 ± 1,8	10,2 ± 2,9	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	13,9 ± 2,4	15,1 ± 2,0	0,0	5,6 ± 1,5	18,7 ± 2,6	0,0	7,7 ± 2,5	8,4 ± 1,8	2,9 ± 2,3	0,0	20,7 ± 4,5
E173 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	15,4 ± 1,4	22,6 ± 1,1	0,0	7,3 ± 2,2	21,7 ± 5,2	0,0	7,8 ± 3,6	10,7 ± 1,2	5,1 ± 0,8	1,8 ± 1,1	16,3 ± 2,4
	MRS	0,0	5,9 ± 1,1	23,4 ± 2,0	0,0	1,3 ± 0,7	22,8 ± 2,3	0,0	8,7 ± 3,7	11,7 ± 4,2	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	12,9 ± 2,3	21,7 ± 2,2	0,0	5,2 ± 0,8	21,6 ± 2,3	0,0	17,6 ± 2,1	10,8 ± 0,8	0,0	4,2 ± 4,4	21,6 ± 3,6
E198 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	15,0 ± 2,2	19,8 ± 2,9	0,0	6,4 ± 0,7	20,4 ± 3,0	0,0	8,7 ± 3,2	9,8 ± 2,0	2,7 ± 0,7	0,0	21,9 ± 1,6
	MRS	0,0	7,2 ± 1,8	21,0 ± 2,1	0,0	0,0	18,2 ± 2,7	0,0	10,8 ± 3,5	10,8 ± 2,4	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	13,6 ± 1,8	20,0 ± 2,3	0,0	4,8 ± 1,7	19,9 ± 4,1	0,0	7,2 ± 3,0	9,9 ± 2,5	1,8 ± 0,7	0,0	22,3 ± 1,4
E216 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	14,8 ± 2,0	23,1 ± 1,5	0,0	8,8 ± 2,0	20,2 ± 1,9	6,7 ± 1,3	9,1 ± 5,0	12,4 ± 1,0	5,3 ± 2,6	0,0	17,2 ± 2,5
	MRS	0,0	3,0 ± 1,7	21,8 ± 3,3	0,0	0,0	17,8 ± 2,8	7,8 ± 1,4	20,9 ± 2,9	11,1 ± 1,3	0,0	0,0	12,0 ± 2,1
	LSM	0,0	11,7 ± 1,2	22,4 ± 1,7	0,0	4,3 ± 1,1	19,1 ± 1,8	7,8 ± 1,2	13,1 ± 3,6	11,6 ± 2,4	0,0	0,0	18,0 ± 1,7

* A mm-ben feltüntetett gátlózona-átmérők 3 technikai × 2 biológiai ismétlés átlag- és szórásértékei.

** CN10: 10 µg gentamicin, C30: 30 µg kloramfenikol, VA30: 30 µg vankomicin, S10: 10 µg sztreptomycin, E15: µg eritromicin, DA2: 2 µg klindamicin, AM10: 10 µg ampicillin, TE30: 30 µg tetraciklin, K30: 30 µg kanamicin, NA30: 30 µg nalidixsav, SXT25: 1,25 µg trimetoprim + 23,75 µg szulfametoxazol.

4.3. Genetikai azonosítás

A genetikai azonosítás eredményeit a **6. táblázat** foglalja össze. Látható, hogy az erdélyi nyerstej-, aludttej- és sajtminiókból izolált törzsek mindegyike a laktobacillusok közé tartozott [11]. A szekvenálás nyomán sikerült egy *Lcb. paracasei* subsp. *tolerans*-t, öt *Levilactobacillus brevis*-t és egy *Lpb. plantarum*-ot beazonosítani. A pontosság 99-100%-os volt, tehát az azonosítás mindenhol egyértelmű eredményt hozott.

6. táblázat. A genetikai azonosítás eredményeinek összefoglalása

Izolátum	Azonos/ összes nukleotid száma	Eltérő	Hiányzó	Azonosított törzs
		bázispárok száma		
E10	1070 / 1070 (100%)	0	0	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> NBRC 15906
E15	1199 / 1200 (99,9%)	1	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E66	1194 / 1194 (100%)	0	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E92	1118 / 1120 (99,8%)	2	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E173	995 / 999 (99,6%)	4	3	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E198	1185 / 1198 (98,9%)	13	11	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E216	1102 / 1102 (100%)	0	0	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149

5. Következtetések

A probiotikus törzsek szelektálására szolgáló *in vitro* tesztrendszer további elemeinek kimunkálására és alkalmazására irányuló törekvésünk összességében sikeres volt. Az egyes lépéseket nem feltétlenül szükséges tovább finomítani, hiszen már jelenlegi formájukban is alkalmasak akár nagyobb izolátummennyiség előszelektálására. Amennyiben a törzseket probiotikumként tervezzük felhasználni, érdemes lehet számos, egyéb patogén mikrobára gyakorolt gátló aktivitásukat tesztelni, valamint az átadható antibiotikum-rezisztenciagének jelenlétét molekuláris biológiai módszerekkel feltérképezni. Az *in vitro* tesztrendszer összes elemének alkalmazása során, izolátumaink között nem találtunk olyat, amely teljes biztonsággal alkalmazható lenne probiotikus termékek előállításához. Ugyanakkor bebizonyosodott, hogy tesztrendszerünk alkalmas a nem biztonságos izolátumok hatékony kiszűrésére.

6. Köszönetnyilvánítás

Hatvan Zoltán köszöni az Innovációs és Technológia Minisztérium Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatását (projekt azonosító: ÚNKP-21-2-I-SZE-32).

A szerzők köszönik a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból finanszírozott RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt támogatását.

7. Irodalom

- [1] Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66 pp. 365-378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- [2] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11 pp. 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- [3] Fijan, S., Frauwallner, A., Varga, L., Langerholc, T., Rogelj, I., Lorber, M., Lewis, P., Povalej-Bržan, P. (2019): Health professionals' knowledge of probiotics: an international survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 3128. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173128>

- [4] Fijan, S., ter Haar, J.A., Varga, L. (2021) Probiotic microorganisms and their benefit to human health. In *Advances in Probiotics: Microorganisms in Food and Health*, eds. Dhanasekaran, D., Sankaranarayanan, A. pp. 3-22. Academic Press and Elsevier: London, San Diego, Cambridge, Oxford. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00001-0>
- [5] Süle, J., Varga, L., Varga, K., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) Probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas kísérleti rendszer egyes elemeinek kidolgozása (Developing basic elements of an experimental system for selection of probiotic bacterial strains). *Magyar Állatorvosok Lapja* 144 (közlésre benyújtva).
- [6] Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015): Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology* 6 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>
- [7] Williams, C.F., Walton, G.E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G.R. (2015): Comparative analysis of intestinal tract models. *Annual Review of Food Science and Technology* 6 pp. 329-350. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015429>
- [8] Antal, O., Némethné Szerdahelyi, E., Takács, K. (2020): *In vitro* humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén (Application of *in vitro* human digestion models in the field of nutrition science). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 66 pp. 3141-3157.
- [9] Süle, J., Varga, L., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) *In vitro* tesztrendszer alkalmazása probiotikus baktériumtörzsek szelektálására (Application of an *in vitro* test system for the selection of probiotic bacterial strains). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 68 pp. 3904-3927.
- [10] Ouwehand, A.C., Forssten, S., Hibberd, A.A., Lyra, A., Stahl, B. (2016): Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine* 48 pp. 246-255. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232>
- [11] Zheng, J.S., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. (2020): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 70 pp. 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- [12] URL¹: <https://www.mn-net.com/media/pdf/91/f9/1f/Instruction-NucleoSpin-Microbial-DNA.pdf> (Hozzáférés: 2022. 05. 03.)
- [13] URL²: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Hozzáférés: 2022. 04. 11.)
- [14] Miao, J.Y., Guo, H.X., Ou, Y.W., Liu, G., Fang, X., Liao, Z.L., Ke, C., Chen, Y.J., Zhao, L.C., Cao, Y. (2014): Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control* 42 pp. 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.041>
- [15] Maragkoudakis, 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 pp. 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>
- [16] International Organization for Standardization (ISO), International Dairy Federation (IDF) (2010): Milk and milk products – Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB). International Standard ISO 10932:2010(E) and IDF 223:2010(E). ISO, Geneva, Switzerland and IDF, Brussels, Belgium.
- [17] Huys, G., D'Haene, K., Swings, J. (2002): Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Letters in Applied Microbiology* 34 pp. 402-406. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01109.x>
- [18] Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (2001): Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food Protection* 64 pp. 2007-2014. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.12.2007>
- [19] Wolupeck, H.L., Morete, C.A., DallaSanta, O.R., Luciano, F.B., Madeira, H.M.F., de Macedo, R.E.F. (2017): Methods for the evaluation of antibiotic resistance in *Lactobacillus* isolated from fermented sausages. *Ciência Rural* 47 e20160966. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160966>