

In vitro tesztrendszer további elemeinek alkalmazása probiotikus baktériumtörzsek szelektálására

1. BEVEZETÉS

A probiotikumok élő mikroorganizmusok, amelyek kellően nagy mennyiségben alkalmazva jótékonyan hatnak az emberi- és az állati szervezet egészségi állapotára (Fuller, 1989).^[2] Pozitív élettani hatásaik egy része széles körűen elterjedt (Hill és mtsai, 2014).^[3] Világszerte rengeteg baktériumtörzset izolálnak azzal a céllal, hogy kiemelkedő tulajdonságú, feltételezeten probiotikus törzseket találjanak köztük. A drága és komplikált állatkísérleteket meg kell előznie egy *in vitro* vizsgálatokból álló preszelekciós rendszernek, mellyel gyorsan, egyszerűen és költséghatékonyan kiválaszthatók azok a törzsek – akár több ezer izolátum közül is –, amelyek probiotikusnak bizonyulnak a majdani *in vivo* kísérletekben. Korábbi vizsgálataink során, erdélyi nyerstej-, aludttej-, valamint sajtminiókból izolált baktériumtörzseket (n = 217) teszteltünk, és összesen hat Gram-pozitív, nem hemolizáló, kataláz-negatív, jól aggregálódó, jó sav- és epesav-tűrő törzset találtunk közöttük. 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 (Ouweland és mtsai, 2016).^[4] A preszelekciós munkát követően, munkánk célja az *in vitro* tesztrendszer további elemeinek ki-

[1] MSc hallgató, Széchenyi IstvánEgyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Víz- és Környezettudományi Tanszék. Témavezetők: Dr. Varga László, egyetemi tanár, SZE MÉK Élelmiszertudományi Tanszék és Dr. Süle Judit, tudományos munkatárs, MTKI Kft.

[2] FULLER, R.: Probiotics in man and animals, in *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 1989, pp. 365–378.

[3] HILL, C. ET AL.: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, in *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11, 2014, pp. 506–514.

[4] OUWEHAND, A. C. – FORSSTEN, S. – HIBBERD, A. A. – LYRA, A. – STAHL, B.: Probiotic approach to prevent antibiotic resistance, in *Annals of Medicine*, 48, 2016, pp. 246–255.

dolgozása és értékelése volt, melynek keretében a kiválasztott baktériumtörzsek antibiotikum-rezisztenciáját és antimikrobiális aktivitását vizsgáltuk és genotípusba sorolásukat is elvégeztük. A célunk olyan probiotikus törzs(ek) szelekciója volt, amely antimikrobiális hatású anyagokat termel patogén mikroorganizmusokkal szemben, miközben nem rezisztens egyetlen antibiotikumra sem és genetikailag a *Lactobacillus* nemzetségbe, vagy annak valamelyik utódnemzetségébe (Zheng és mtsai, 2020)^[5] tartozik.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteinket a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézeti Kft. mosonmagyaróvári részlegének K+F+I osztályának Mikrobiológia és Biotechnológia laboratóriumában végeztük.

2.1. A kísérletbe bevont baktériumtörzsek

Korábbi munkánk 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 vontuk be további kísérleteinkbe, mert az előzetes eredmények alapján ez szerepelt leggyengébben az összes vizsgálatban. Kíváncsiak voltunk, hogy a további tesztek során képes lesz-e jobb eredményeket elérni, vagy továbbra is minden fontos tulajdonságban jelentősen alulmúlja a többi törzset.

[5] ZHENG, J. S. ET AL.: 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*, in *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 70, 2020, pp. 2782–2858.

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

Törzs	Belső azonosító	T / H / I / K*
<i>Lactocaseibacillus 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
<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

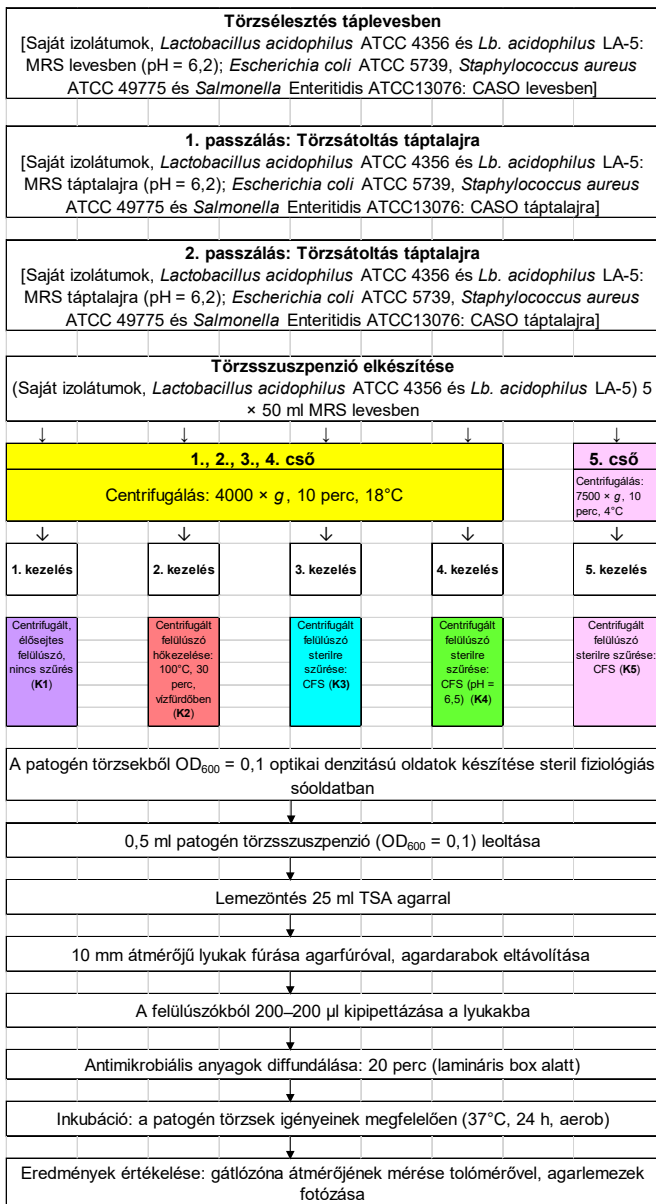
* T: fenntartó tápközeg, H: tenyésztési hőfok (°C), I: tenyésztési idő (óra), K: tenyésztési körülmény (A: aerob, AN: anaerob).

** Saját izolátumainkról a vizsgálatok végén, a genetikai azonosítás eredményeként derült ki, hogy mely fajba tartozó törzsek.

2.2. Antimikrobiális aktivitás vizsgálata

Az antimikrobiális aktivitás vizsgálatot az 1. ábra lépései szerint hajtottuk végre.

1. ábra: Az antimikrobiális aktivitás vizsgálatának folyamata



2.3. Antibiotikum-rezisztencia vizsgálat

MRS táptalajon felélesztettük a baktériumtörzseinket, majd a számukra optimális körülményeket biztosítva inkubáltuk őket. Ezután egy szoliter telepet átoltottunk újabb MRS táptalaj felszínére, hogy biztosan egy telepből induljunk ki és ne kevert tenyészzel 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-Sensitestagar, 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). Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatokhoz használt érzékenységi korongokról ad információt a 2. táblázat. Egy nap elteltével a lemezeken kialakult gátlózónákat tolómérővel megmértük. A gátlózónák méretéből mindig levontuk a korong átmérőjét (6 mm).

2. táblázat: Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatokhoz használt érzékenységi korongok és azok 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
Sztreptomicin	10	S10
Tetraciklin	30	TE30
Trimetoprim + Szulfametoxazol	1,25 + 23,75	SXT25
Vankomicin	30	VA30

2.4. Genetikai azonosítás

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

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. Antimikrobiális aktivitás vizsgálat eredményei

Az antimikrobiális aktivitás vizsgálat eredményeit összegzi a 3. táblázat.

3. táblázat: Az antimikrobiális aktivitás vizsgálatának eredményei*

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

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

Összességében elmondható, hogy egyik tesztelt izolátumunknak sem volt hatása az *E. coli*s és a *Staphylococcus aureus* vizsgált törzseire. Eredményeink hasonlóak Maragkoudakis és mtsai^[6](2006) eredményeihez, akik nyerstejből *Lb. acidophilus* ACA-DC 295, Cheddar sajtból *Lcb. paracasei subsp. paracasei* ACA-DC 3345, Kasserai 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 lyukteszttekkel. Megállapították, hogy a 29 db tejsavbaktérium izolátum sejtmentes felülszójának egyike sem gátolta a patogén *E. coli*, a *Salm. Typhimurium* és a *Helicobacter pylori* törzseinek szaporodását.

3.2. Antibiotikum-rezisztencia vizsgálat eredményei

A vizsgálatok során felmerült, hogy a tejsavbaktériumok tenyésztéséhez általánosan használt MRS tápközeg antagonist hatást fejthet ki az egyes antibiotikumokkal szemben. E hatás kiküszöbölésének érdekében fejlesztették ki az LSM tápközeget, amely 90%-ban Iso-Sensitestagarból és 10%-ban MRS agarból áll. Az LSM táptalaj bizonyítottan elősegíti a laktobacillusok és a bifidobaktériumok szaporodását, miközben minimalizálja a potenciális antagonizmust a tápközeg komponensei és a tesztelt antimikrobiális szerek között (Huys és mtsai, 2002^[7]).

Vizsgálataink eredményei a 4. táblázatban láthatók. Mind a *Lb. acidophilus* ATCC 4356, mind az előszelektált izolátumaink rezisztensnek bizonyultak vancomycinre és nalidixsavra, amire magyarázatul szolgál Charteris és mtsainak (2001)^[8] közlése, miszerint a *Lactobacillus* fajok eredendően nalidixsav-rezisztensek. Wolupeck és mtsai (2017)^[9] *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.

[6] MARAGKOUKAKIS, P. A. – ZOUMPOPOULOU, G. – MIARIS, C. – KALANTZOPOULOS, G. – POT, B. – TSAKALIDOU, E.: Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products, in *International Dairy Journal*, 16, 2006, pp. 189–199.

[7] HUYS, G. – D'HAENE, K. – SWINGS, J.: Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method, in *Letters in Applied Microbiology*, 34, 2002, pp. 402–406.

[8] CHARTERIS, W. P. – KELLY, P. M. – MORELLI, L. – COLLINS, J. K. (2001): Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli, in *Journal of Food Protection*, 64, 2001, pp. 2007–2014.

[9] Wolupeck, H. L. – Morete, C. A. – Dalla Santa, O. R. – Luciano, F. B. – Madeira, H. M. F. – De Macedo, R. E. F.: Methods for the evaluation of antibiotic resistance in *Lactobacillus* isolated from fermented sausages, in *Ciência Rural*, 2017, 47 e20160966.

Említést érdemel, hogy a *Lb. acidophilus* ATCC 4356 nem szaporodott Iso-Sensitest táptalajon, a vizsgálat eredménye ezért értékelhetetlennek bizonyult (4. táblázat). Huys és mtsai (2002⁷) szintén arra a következtetésre jutottak, hogy az Iso-Sensitest tápközeg általánosságban nem ajánlható tejsavbaktériumok antibiotikum-érzékenységeinek tesztelésére.

4. táblázat: Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok eredményei*

Törzs	Táptalaj	Úres korong	Antibiotikum ^{***}										
			CN10	C30	VA30	S10	E15	DA2	AM10	TE30	K30	NA30	SXT25
Lactobacillus acidophilus ATCC 4356	Iso-Sensitest	0	0	25,2 ± 1,6	0	8,7 ± 2,3	23,5 ± 0,8	0	9,0 ± 3,5	21,0 ± 7,0	0	0	0
E10	LMRS	0	11,5 ± 4,6	23,8 ± 1,5	0	10,2 ± 4,7	25,5 ± 2,9	0	0	18,8 ± 6,9	0	0	0
	Iso-Sensitest	0	17,0 ± 2,2	20,0 ± 2,3	0	13,2 ± 2,7	29,5 ± 3,5	7,7 ± 0,8	0	26,7 ± 4,6	2,5 ± 2,1	0	4,7 ± 2,7
E15	LMRS	0	0	25,5 ± 2,1	0	0	21,2 ± 4,6	11,0 ± 7,6	5,7 ± 1,0	20,3 ± 4,1	0	0	0
	Iso-Sensitest	0	12,1 ± 2,8	23,0 ± 0,6	0	7,2 ± 2,8	22,3 ± 5,6	12,3 ± 4,5	0	21,0 ± 1,9	0	0	5,5 ± 3,2
E66	LMRS	0	17,2 ± 4,1	24,2 ± 4,9	0	12,2 ± 0,8	25,2 ± 2,6	0	0	10,8 ± 2,0	8,5 ± 2,4	0	17,0 ± 2,4
	Iso-Sensitest	0	2,7 ± 0,5	25,0 ± 0,9	0	0	20,3 ± 1,9	0	0	12,5 ± 2,6	0	0	0
E92	LMRS	0	14,3 ± 0,5	23,5 ± 2,3	0	3,0 ± 0,9	21,8 ± 2,3	0	0	10,0 ± 2,0	0	0	22,7 ± 1,2
	Iso-Sensitest	0	18,7 ± 0,8	21,2 ± 2,9	0	11,7 ± 0,5	25,3 ± 0,8	0	0	10,8 ± 2,0	8,8 ± 2,1	0	16,0 ± 1,3
E173	LMRS	0	2,0 ± 0,9	25,2 ± 1,6	0	0	22,2 ± 1,6	0	5,7 ± 1,2	14,3 ± 0,8	2,3 ± 0,5	0	0
	Iso-Sensitest	0	14,5 ± 1,5	21,8 ± 3,4	0	4,3 ± 2,1	22,2 ± 1,5	0	0	12,7 ± 0,8	2,5 ± 1,0	0	22,7 ± 1,2
E198	LMRS	0	17,1 ± 2,7	19,4 ± 3,8	0	8,6 ± 2,7	18,2 ± 4,6	0	8,6 ± 4,0	8,3 ± 1,7	6,0 ± 1,9	0	14,3 ± 3,3
	Iso-Sensitest	0	7,3 ± 1,0	21,4 ± 2,2	0	1,0 ± 0,1	17,6 ± 1,9	0	10,2 ± 1,8	10,2 ± 2,9	0	0	0
E216	LMRS	0	13,9 ± 2,4	15,1 ± 2,0	0	5,6 ± 1,5	18,7 ± 2,6	0	7,7 ± 2,5	8,4 ± 1,8	2,9 ± 2,3	0	20,7 ± 4,5
	Iso-Sensitest	0	15,4 ± 1,4	22,6 ± 1,1	0	7,3 ± 2,2	21,7 ± 5,2	0	7,8 ± 3,6	10,7 ± 1,2	5,1 ± 0,8	1,8 ± 1,1	16,3 ± 2,4
E216	LMRS	0	5,9 ± 1,1	23,4 ± 2,0	0	1,3 ± 0,7	22,8 ± 2,3	0	8,7 ± 3,7	11,7 ± 4,2	0	0	0
	Iso-Sensitest	0	12,9 ± 2,3	21,7 ± 2,2	0	5,2 ± 0,8	21,6 ± 2,3	0	17,6 ± 2,1	10,8 ± 0,8	0	4,2 ± 4,4	21,6 ± 3,6
E216	LMRS	0	15,0 ± 2,2	19,8 ± 2,9	0	6,4 ± 0,7	20,4 ± 3,0	0	8,7 ± 3,2	9,8 ± 2,0	2,7 ± 0,7	0	21,9 ± 1,6
	Iso-Sensitest	0	7,2 ± 1,8	21,0 ± 2,1	0	0	18,2 ± 2,7	0	10,8 ± 3,5	10,8 ± 2,4	0	0	0
E216	LMRS	0	13,6 ± 1,8	20,0 ± 2,3	0	4,8 ± 1,7	19,9 ± 4,1	0	7,2 ± 3,0	9,9 ± 2,5	1,8 ± 0,7	0	22,3 ± 1,4
	Iso-Sensitest	0	14,8 ± 2,0	23,1 ± 1,5	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	17,2 ± 2,5
E216	LMRS	0	3,0 ± 1,7	21,8 ± 3,3	0	0	17,8 ± 2,8	7,8 ± 1,4	20,9 ± 2,9	11,1 ± 1,3	0	0	12,0 ± 2,1
	Iso-Sensitest	0	11,7 ± 1,2	22,4 ± 1,7	0	4,3 ± 1,1	19,1 ± 1,8	7,8 ± 1,2	13,1 ± 3,6	11,6 ± 2,4	0	0	18,0 ± 1,7

* A mm-ben feltüntetett gátlózóna-átmérők 3 technikai × 2 biológiai ismételés 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.

3.3. Genetikai azonosítás eredményei

A genetikai azonosítás eredményeit az 5. táblázat foglalja össze. Látható, hogy az erdélyi nyerstej-, aludttej- és sajtmintákból izolált törzsek mindegyike a *Lactobacillus* közé tartozott. 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.

5. táblázat: A genetikai azonosítás eredményeinek összefoglalása

Izolátum	Azonos / összes nukleotid száma	Eltérő	Hiányzó	Azonosított törzs
		bázispárok száma		
E10	1070 / 1070 (100%)	0	0	<i>Lacticaseibacillus 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

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munkánkban az előszelektált törzsek ($n = 7$) mikrobaellenes aktivitását agardiffúziós lyuktesztel vizsgáltuk. 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. Az izolátumok több antibiotikummal szemben is rezisztensnek bizonyultak, ezért nem használhatóak fel probiotikus termékek előállításához. A probiotikus törzsek szelektálására szolgáló *in vitro* tesztrendszer további elemeinek kimunkálására és alkalmazására irányuló törekvésünk összességében sikeres volt. Az egyes lépéseket nem okvetlenül 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.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- CHARTERIS, W. P. – KELLY, P. M. – MORELLI, L. – COLLINS, J. K. (2001): Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli, in *Journal of Food Protection*, 64, 2001, pp. 2007–2014.
- FULLER, R.: Probiotics in man and animals, in *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 1989, pp. 365–378.
- HILL, C. ET AL.: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, in *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11, 2014, pp. 506–514.
- HUYS, G. – D’HAENE, K. – SWINGS, J.: Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method, in *Letters in Applied Microbiology*, 34, 2002, pp. 402–406.
- MARAGKOUidakis, P. A. – ZOUMPOPOULOU, G. – MIARIS, C. – KALANTZOPOULOS, G. – POT, B. – TSAKALIDOU, E.: Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products, in *International Dairy Journal*, 16, 2006, pp. 189–199.
- OUWEHAND, A. C. – FORSSTEN, S. – HIBBERD, A. A. – LYRA, A. – STAHL, B.: Probiotic approach to prevent antibiotic resistance, in *Annals of Medicine*, 48, 2016, pp. 246–255.
- WOLUPECK, H. L. – MORETE, C. A. – DALLA SANTA, O. R. – LUCIANO, F. B. – MADEIRA, H. M. F. – DE MACEDO, R. E. F.: Methods for the evaluation of antibiotic resistance in *Lactobacillus* isolated from fermented sausages, in *Ciência Rural*, 2017, 47 e20160966.
- ZHENG, J. S. ET AL.: 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*, in *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 70, 2020, pp. 2782–2858.