

**ILLÓOLAJOK HATÁSA ÉLELMISZERIPARBAN ELŐFORDULÓ  
MIKROORGANIZMUSOK BIOFILMKÉPZÉSÉRE ÉS SEJT-SEJT  
KÖZÖTTI KOMMUNIKÁCIÓJÁRA**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**KEREKES ERIKA BEÁTA**

**TÉMAVEZETŐK**

**DR. KRISCH JUDIT**

EGYETEMI DOCENS

**PROF. DR. VÁGVÖLGYI CSABA**

EGYETEMI TANÁR



**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR**

**MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED**

**2017**

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. BEVEZETÉS</b>                                                   | 5  |
| <b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>                                         | 6  |
| <b>2.1 Biofilmek általános jellemzése</b>                             | 6  |
| 2.1.1 <i>Letapadás</i>                                                | 7  |
| 2.1.2 <i>A mikrokolóniák kialakulása</i>                              | 8  |
| 2.1.3 <i>Az érett biofilm kialakulása</i>                             | 8  |
| 2.1.4 <i>A sejtek leválása a biofilmről</i>                           | 9  |
| <b>2.2 Kevert biofilmek</b>                                           | 9  |
| 2.2.1 <i>A kevert közösségek kialakulását befolyásoló tényezők</i>    | 10 |
| <b>2.3 Biofilmek az élelmiszeriparban</b>                             | 10 |
| <b>2.4 A biofilmképzés gátlása az élelmiszeriparban</b>               | 12 |
| <b>2.5 A quorum sensing (QS) mechanizmusa</b>                         | 13 |
| 2.5.1 <i>Gram-negatív baktériumok QS rendszere</i>                    | 14 |
| 2.5.2 <i>Gram-pozitív baktériumok QS rendszere</i>                    | 15 |
| 2.5.3 <i>Gombák QS rendszere</i>                                      | 15 |
| 2.5.4 <i>Fajok közötti QS rendszerek</i>                              | 15 |
| 2.5.5 <i>A quorum érzékelés gátlása</i>                               | 16 |
| <b>2.6 Illóolajok jellemzése</b>                                      | 17 |
| <b>2.7 Illóolajok hatása baktériumokra</b>                            | 18 |
| <b>2.8 Illóolajok hatása élesztőgombákra</b>                          | 19 |
| <b>2.9 Illóolajok felhasználása élelmiszeripari termékekben</b>       | 19 |
| 2.9.1 <i>Állati eredetű termékek</i>                                  | 20 |
| 2.9.2 <i>Növényi eredetű termékek</i>                                 | 20 |
| 2.9.3 <i>Jogi szabályozás</i>                                         | 20 |
| 2.9.4 <i>Illóolajok citotoxikussága</i>                               | 21 |
| <b>2.10 Felhasznált illóolajok bemutatása</b>                         | 22 |
| 2.10.1 <i>Citrom</i>                                                  | 22 |
| 2.10.2 <i>Boróka</i>                                                  | 22 |
| 2.10.3 <i>Fahéj</i>                                                   | 22 |
| 2.10.4 <i>Kakukkfű</i>                                                | 22 |
| 2.10.5 <i>Majoránna</i>                                               | 23 |
| 2.10.6 <i>Muskotályszálya</i>                                         | 23 |
| <b>2.11 A kísérlet során felhasznált mikroorganizmusok jellemzése</b> | 23 |
| 2.11.1 <i>Bacillus cereus var. mycoides</i>                           | 23 |
| 2.11.2 <i>Bacillus subtilis</i>                                       | 23 |
| 2.11.8 <i>Serratia marcescens</i>                                     | 25 |

|           |                                                                                                            |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.11.9    | <i>Pichia anomala</i> .....                                                                                | 26 |
| 2.11.10   | <i>Debaryomyces hansenii</i> .....                                                                         | 26 |
| 2.11.11   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                                                                      | 26 |
| 2.11.12   | <i>Chromobacterium violaceum</i> 85WT .....                                                                | 26 |
| 2.11.13   | <i>Rhizobium radiobacter</i> NTL4 (pZLR4) .....                                                            | 27 |
| 2.11.14   | <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 .....                                                               | 27 |
| 2.11.15   | <i>Escherichia coli</i> JM 109 pSB 535 és pSB 1075.....                                                    | 27 |
| <b>3.</b> | <b>CÉLKITŰZÉSEK</b> .....                                                                                  | 28 |
| <b>4.</b> | <b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....                                                                          | 29 |
| 4.1       | Tápközegek .....                                                                                           | 29 |
| 4.2       | Mikroorganizmusok .....                                                                                    | 30 |
| 4.3       | Baktériumtörzsek izolálása és meghatározása élelmiszerekről.....                                           | 31 |
| 4.4       | A felhasznált illóolajok és illóolaj összetevők .....                                                      | 33 |
| 4.5       | Tenyésztési körülmények.....                                                                               | 34 |
| 4.6       | Antimikrobiális hatás és biofilmképzés gátlás vizsgálata.....                                              | 34 |
| 4.6.1     | Minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározása .....                                                    | 34 |
| 4.6.2     | Biofilmképzés gátlása .....                                                                                | 35 |
| 4.6.3     | Biofilmképzés gátlás vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével .....                       | 36 |
| 4.7       | A QS mechanizmus vizsgálata .....                                                                          | 37 |
| 4.7.1     | QS jelemolekulák jelenlétének kimutatása .....                                                             | 37 |
| 4.7.2     | Anti-QS hatás vizsgálata szilárd és folyadéktenyészetekben .....                                           | 38 |
| 4.7.3     | A QS gátlás és biofilmképzés gátlás közti összefüggés vizsgálata.....                                      | 39 |
| 4.8       | Illóolajok hatása élelmiszereken .....                                                                     | 40 |
| 4.8.1     | Nyers csirkehúson kialakuló <i>L. monocytogenes</i> biofilmek eltávolítása illóolajos<br>páclevekkel ..... | 40 |
| 4.8.2     | Földieper eltarthatóságának növelése illóolajos gőztér segítségével .....                                  | 41 |
| 4.8.3     | Koktélparadicsom eltarthatóságának növelése illóolajos gőztér segítségével.....                            | 42 |
| 4.8.4     | Gyümölcslevek eltarthatóságának növelése illóolajok segítségével.....                                      | 43 |
| 4.9       | Alkalmazott statisztikai módszerek.....                                                                    | 44 |
| <b>5.</b> | <b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b> .....                                                                     | 45 |
| 5.1       | Baktériumtörzsek izolálása és meghatározása élelmiszerekről .....                                          | 45 |
| 5.2       | Illóolajok és fő komponenseik antimikrobiális és biofilmképzést gátló hatása .....                         | 47 |
| 5.2.1     | Illóolajok összetétele.....                                                                                | 47 |
| 5.2.2     | MIC értékek meghatározása .....                                                                            | 48 |
| 5.2.3     | Illóolajok és komponenseik biofilmképződést gátló hatása .....                                             | 53 |

|                                                                                                                                                                               |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.4 Illóolajok és fő komponenseik anti-biofilm hatásának vizsgálata pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek segítségével egyfajos és kevert közösségek esetében..... | 72         |
| <b>5.3 A QS mechanizmus vizsgálata .....</b>                                                                                                                                  | <b>77</b>  |
| 5.3.1 AHL jelemolekulák kimutatása .....                                                                                                                                      | 77         |
| 5.3.3 Illóolajok és fő komponenseik anti-QS hatásának vizsgálata.....                                                                                                         | 81         |
| 5.3.4 A QS gátlás és biofilm képzés gátlás közti összefüggés vizsgálata.....                                                                                                  | 91         |
| <b>5.4 Illóolajok hatása élelmiszereken .....</b>                                                                                                                             | <b>94</b>  |
| 5.4.1 Nyers csirkemelleken kialakuló <i>L. monocytogenes</i> biofilmek eltávolítása illóolajos páclevek alkalmazásával .....                                                  | 94         |
| 5.4.2 Nyers csirkemellek felületéről készített elektronmikroszkópos (SEM) felvételek .....                                                                                    | 98         |
| 5.4.3 Friss földieper eltarthatóságának növelése illóolajos gőztér segítségével .....                                                                                         | 99         |
| 5.4.4 Koktélpáradicsom eltarthatóságának növelése illóolajos gőztér segítségével.....                                                                                         | 102        |
| 5.4.5 Gyümölcslevek eltarthatóságának növelése illóolajok segítségével.....                                                                                                   | 104        |
| <b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>                                                                                                                                                 | <b>109</b> |
| <b>7. SUMMARY .....</b>                                                                                                                                                       | <b>112</b> |
| <b>8. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>                                                                                                                                               | <b>116</b> |
| <b>9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>                                                                                                                                           | <b>126</b> |

## Rövidítések jegyzéke

AB: Autoinducer broth (Autoinducer tápoldat)  
AHL: acil homoszerin lakton  
AI2: autoinducer 2  
AIP: autoinducer peptid  
BBL: brillantzöld-laktóz-epe leves  
DMSO: dimetil szulfoxid  
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav  
EFSA: European Food Safety Authority  
EPS: extracellular polymeric substance (extracelluláris poliszacharid)  
FA: food additive (élelmiszer adalék)  
FDA: Food and Drug Administration  
G-negatív: Gram negatív  
G-pozitív: Gram pozitív  
GRAS: Generally Regarded As Safe  
LB: Luria-Bertani tápleves/táptalaj  
LETS: lítium-EDTA-Tris HCL puffer  
MEA: malátás tápoldat/táptalaj  
MFC: minimal fungicid concentration (minimális fungicid koncentráció)  
MIC: minimal inhibitory concentration (minimális gátló koncentráció)  
MM: mosott húsminták  
NCBI: National Center for Biotechnology Information  
NÉBIH: Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal  
NM: nem mosott húsminták  
PCI: fenol: kloroform: izoamil-alkohol  
QQ: *quorum quenching* (quorum kioltás)  
QS: *quorum sensing* (quorum érzékelés)  
SZMC: Szeged Microbiological Collection  
TAE: Tris-Acetát-EDTA puffer  
TGE: tripton-glükóz tápoldat/táptalaj  
TKE: telepképző egység  
TSB: tripton-szója tápoldat/táptalaj  
WHO: World Health Organization

## 1. BEVEZETÉS

A mikrobiológiai szennyeződés okozta gyors romlás miatt még napjainkban is nagy mennyiségű élelmiszer megy veszendőbe, sokszor még azelőtt, hogy eljutna a fogyasztókhoz. A mikroorganizmusok által szennyezett élelmiszerek nemcsak az élelmiszeriparnak jelentenek komoly gondot, hanem az egészségügy számára is, ugyanis az ételmérgezések még ma is jelentős esetszámban fordulnak elő. A hagyományos szintetikus kémiai tartósítószer használata sok esetben nem vezet a várt eredményhez, illetve esetenként kellemetlen melléktermékek keletkezését idézhetik elő. Nem hagyható említés nélkül az sem, hogy a tudatos táplálkozás és környezetbarát termékek népszerűsége a fogyasztók körében növekszik, és ezért egyfajta fogyasztói elvárás az élelmiszerek tartósításának reformja. Mindezekből következően fontos lenne új, természetes eredetű, hatékony antimikrobiális szerek kifejlesztése, amelyek legalább részben helyettesíthetik a szintetikus tartósítószereket.

A biofilmbe szerveződés egyfajta védelmet biztosít a baktérium közösségeknek a kedvezőtlen körülményekkel szemben, de hozzájárulhat a tápanyagok jobb elérhetőségéhez is. Összehasonlítva a szabadon úszó (planktonikus) sejtekkel, ezek a közösségek például fokozott ellenállást mutatnak fertőtlenítőkszerekkel és antibiotikumokkal szemben. A baktérium közösség tagjai közötti kommunikáció, a *quorum sensing* (QS, quorum érzékelés) nagyon összetett folyamat. A QS, a virulencia-faktorok szintézise, az extracelluláris poliszacharidok termelése és a mikrobiális biofilm képzése mellett szabályozza a baktériumok patogenitását is, ezért a folyamat működésének pontos megértése alapvető fontosságú, esetleges gátlását biztosító módszereknek pedig közvetlen gyakorlati jelentősége is lehet.

Kísérleti munkánk során célunk az volt, hogy vizsgáljuk néhány illóolaj, valamint ezek fő komponenseinek biofilmképzésre és a QS-re gyakorolt hatását, néhány, az élelmiszeriparban gyakran előforduló mikroorganizmus esetében. A vizsgálatokba bevont illóolajok és komponensek a következők voltak: citrom (*Citrus lemon*) és limonén; boróka (*Juniperus communis*) és  $\alpha$ -pinén; majoránna (*Origanum majorana*) és terpinén-4-ol; muskotályzsálya (*Salvia sclarea*) és linalool, fahéj (*Cinnamomun zeylanicum*) és transz-fahéjaldehid, valamint kakukkfű (*Thymus vulgaris*) és timol. Céljaink közé tartozott néhány hatékony illóolaj valódi élelmiszereken tartósítószerként történő tesztelése is.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Biofilmek általános jellemzése

A biofilmek különböző mikroorganizmusok önszerveződő közösségei, amelyek élő és élettelen felületekhez tapadva egybefüggő bevonatot képeznek; ilyen formában sokkal ellenállóbbak a kedvezőtlen körülményekkel szemben (Prakash et al. 2003). Anton van Leeuwenhoek volt az első, aki egyszerű mikroszkópjával a fogáról lekapart lepedéket vizsgálva biofilmet figyelt meg, azonban csak 1978 óta használják a biofilm megnevezést (Costerton et al. 1999). Az 1980-1990-es években kapott igazi lendületet a mikrobiológia ezen területével kapcsolatos kutatás.

A biofilmképzés valószínűleg egy olyan ősi evolúciós stratégia, amely védettebbé tette a mikroorganizmusokat az őket érő kedvezőtlen környezeti hatásokkal szemben, és így számos előnyhöz juttatta a közösséget (López et al. 2010). A biofilmek olyan életformát képviselnek, ahol a szabadon mozgó sejtekéhez képest, a baktériumok genomjának nagyjából 10%-a eltérő módon szabályozott. Azt egyelőre kevés esetben igazolták, hogy az eltérő szabályozás biofilm-specifikus metabolitok és polimerek termeléséhez is vezetne (Beloin et al. 2004). Ugyanakkor azt már tudjuk, hogy amikor termelődnek, akkor ezek a biofilmhez kötött molekulák sok esetben antagonistát hatást fejtenek ki más mikrobákkal szemben egy vegyes közösség esetében (pl. a számos mikroba által termelt valin gátolja a valin-érzékeny *Escherichia coli* törzsek növekedését (Valle et al. 2008)).

A biofilmek nedves felületeket kolonizálnak, például megtalálhatók vízvezetékben, kontaktlencséken, katétereken, patakokban levő kövek nyálkás bevonatában, emberi szöveteken és ennek megfelelően komoly fertőzések okozói is lehetnek (Prakash et al. 2003; Walker et al. 2007). Ezek a közösségek a biofilmekre jellemző specifikus tulajdonságokkal rendelkeznek, mint például magas UV sugárzás és antibiotikum-rezisztencia, genetikai variabilitás, és fagocitózissal szembeni ellenállás. Fontos megemlíteni, hogy szerepük van a szennyező anyagok biodegradációjában, illetve a földi és vízi ökoszisztémákban a tápanyagok körforgásában is (Meng-Ying et al. 2009). Orvosi szemszögből talán a legfontosabb tulajdonságuk az antibiotikumokkal és fertőtlenítőkkel szembeni fokozott rezisztenciájuk (Walker et al. 2007). Ezen ellenállás gyengítése ma már sok kutatás célját képezi.

A biofilm kialakulása során négy szakaszt különíthetünk el: letapadás, mikrokolóniák kialakulása, a fejlett forma (háromdimenziós struktúrák) kialakulása és a leválás.

### 2.1.1 Letapadás

A szabadon úszó mikroorganizmusoknak el kell jutniuk egy felülethez és meg kell tapadniuk rajta ahhoz, hogy egy biofilm alkotóivá válhassanak. Ez a folyamat történhet diffúzióval, légáramlással, lamináris áramlással, illetve ülepedéssel (Walker et al. 2007). Ugyanakkor az is szükséges, hogy a baktériumok olyan közel kerüljenek a megtapadási felülethez, hogy mozgásuk jelentősen lelassuljon, és át tudjanak hatolni a felület hidrodinamikus határrétegén. Ezen a határrétegen átjutva, számos gyenge, reverzibilis vonzóerő (van der Waals erő, elektrosztatikus kölcsönhatás) éri őket, így egy átmeneti kapcsolat alakulhat ki köztük és a felület, vagy a már ott lévő mikroorganizmusok között (Costerton et al. 1999).

A sejtek letapadását számos tényező befolyásolja. Abiotikus felületek esetében (pl. teflon, műanyag, rozsdamentes acél és üveg), kimutatták, hogy a felület érdessége növeli a letapadás valószínűségét (Charaklis et al. 1990). A letapadási folyamatot befolyásolja még a hőmérséklet, tápanyag koncentráció, hidrofób/hidrofil jelleg és az áramlási sebesség. Jelentős szerepe van a sejtek felszínén előforduló flagelláknak, fimbriáknak és makromolekuláknak (poliszacharidok és fehérjék), amelyek jelenléte például egy kevert közösségben a versengés szempontjából előnyt jelenthet (Donlan 2000; Dunne 2002). Tenyésztési körülmények megváltoztatásával kísérletezve Klausen és munkatársai (2003) kimutatták, hogy az ostoros mozgást, amely a letapadáshoz szükséges, jelentősen befolyásolja a szénforrás, illetve a mucin (egy glikoprotein) jelenléte, amely szükséges a *P. aeruginosa* kolonizációjához.

Bizonyított tény, hogy a biofilmet alkotó baktériumok között létezik kommunikáció. Ennek a sejtsűrűség-függő kommunikációnak a segítségével a sejtek értesülnek egymás állapotáról, a közösség számbeli nagyságáról, illetve a környezeti tényezők hatására koordinálják életműködéseiket (Wagner et al. 2003). Ezt a sejt-sejt kommunikációs rendszert nevezték el QS szabályozási mechanizmusnak; ez végbemehet fajon belül, illetve különböző fajok egyedei között is. A folyamatnak szerepe van már a letapadási fázisban, ugyanis a sejtsűrűség mellett a környezeti tényezők is befolyásolják a kommunikációt (Shrout et al. 2006). Erre jó példa a *P. aeruginosa* biofilmképzését serkentő jelrendszere, amelynek beindulása az extracelluláris vas és foszfát ionok elérhetőségétől is függ (Jensen et al. 2006).

Amikor egy abiotikus felületet vizes közegbe helyezünk, szinte azonnal bevonják a környezetben levő polimerek, és egy kondicionáló film jön létre, ami növeli a letapadás mértékét (Donlan 2002).



Biotikus felületekhez való kapcsolódás esetében, mint például szövetek és a nyálkahártya epitélium sejtjei, a folyamatot specifikus receptorok szabályozzák, ugyanakkor befolyásolhatják a gazdatest kolonizációra adott válaszreakcióját is (Kline et al. 2009). Ebben az esetben a kondicionáló film lehet például a vér, a vizelet és a könny.

### 2.1.2 *A mikrokolóniák kialakulása*

A letapadási folyamat befejezését követően kezdődhet a sejtek mikrokolóniákba szerveződése. A baktériumsejtek szaporodnak, miközben különböző kémiai jelmolekulák segítségével kapcsolatba kerülnek a szomszédos sejtekkel (Prakash et al. 2003). Elérve egy bizonyos küszöbértéket, a kémiai jelmolekulák aktiválják azokat a genetikai mechanizmusokat, melyek az extracelluláris poliszacharidok (EPS) képződéséért felelősek. Így a baktériumok az EPS mátrixban beágyazva fognak szaporodni, jellegzetes mikrokolóniákat kialakítva (Costerton et al. 1999).

Több kutatás azt valószínűsíti, hogy a IV-es típusú pilusok jelenléte nélkülözhetetlen a mikrokolóniák kialakulásához; ezeknek ugyanis szerepük van a baktériumok mozgékonyágában, az úgynevezett vibráló mozgásért felelősek (Giltner et al. 2012; Pohlschroder és Esquivel 2015).

### 2.1.3 *Az érett biofilm kialakulása*

A mikrokolóniák folyamatosan fejlődnek, kezdetben a felülettel párhuzamosan, majd a folyadékfázisban terjeszkedve, így kialakítva egy háromdimenziós szerkezetű társulást (Walker 2007). Különböző másodlagos kolonizálók, amelyeknek hiányzik az a képességük, hogy felületekhez tapadjanak, az elsődleges kolonizálókhoz fognak kapcsolódni, adott esetben kialakítva egy akár 30-50  $\mu\text{m}$  vastagságot is elérő biofilmet (Walker 2007).

A biofilmet alkotó sejtek által létrehozott morfológiai képződmény erősen változékony lehet térben és időben, mivel a biofilm háromdimenziós szerkezete sejtcsoportokból, üregekből, pórusokból és poliszacharid természetű extracelluláris anyagból (EPS) áll, amelynek szerkezete dinamikusan változik (Zhang et al. 2006). Az EPS a biofilm szerves széntartalmának 50-90%-át teheti ki, és ebből alakul ki a sejteket körülölelő mátrix. A G-negatív baktériumok EPS rétege főleg anionos. Ennek köszönhetően bizonyos kationok, mint például a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  jól tudnak kapcsolódni a polimer háléhoz, és ellenállóbbá tehetik azt. A G-pozitívak esetében ez a mátrix kationos, néhány koaguláz pozitív baktérium esetében főleg teichoinsav és fehérjék alkotják. A

hidrogénkötések nagy számának köszönhetően a mátrix erősen hidratált és lehet hidrofób és hidrofil jellege is (Sutherland 2001; Donlan 2002). Az EPS-nek fontos szerepe lehet a rezisztencia kialakulásában is, ugyanis az antibiotikumok megkötésével gátolhatja azok beáramlását a biofilm belső rétegeibe (Donlan 2000).

#### 2.1.4 *A sejtek leválása a biofilmről*

A fejlett biofilm kialakulása után sokszor előfordul, hogy egyes baktériumok leválnak, és új felületeket kolonizálnak. A folyamat történhet leánysejtek leválásával az aktívan szaporodó és növekedő sejtekről, vagy a tápanyag koncentrációjának csökkenése miatti vedléssel, vagy akár a nyíróerők (súrlódás) okozta sejtesodródással is. Más oka is lehet a leválásnak, ugyanis azok a baktériumok, amelyek már nem képesek EPS termelésére, kisselektálódhatnak a telepekből (Prakash et al. 2003).

## 2.2 **Kevert biofilmek**

A biofilmek leggyakoribb formája a kevert biofilm közösség. Ezek a közösségek nemcsak a természetben, hanem az emberi szervezetben is jelen vannak, mint például a szájüregben előforduló foglepedék (fogszuvasodást okoz) vagy cisztás fibrózisban szenvedő betegek tüdeje. Kutatásuk és a háttérben zajló folyamatok megértése kulcsfontosságú lehet a jövő orvoslása, illetve a biztonságos élelmiszergyártás szempontjából (Elias and Banin 2012).

Számos kutatás kimutatta, hogy egy kevert közösségben több száz faj is előfordulhat. Paster és munkatársai (2001) a szájüregben előforduló biofilmek közösségét vizsgálva kimutatták, hogy a lágy és kemény szöveteken kialakuló biofilmeket több mint 500 különböző faj alkotja. A folyadéktenyészetekkel ellentétben, a biofilmekben belül levő magas sejtsűrűség és csökkent diffúzió lehetővé teszi olyan folyamatok létrejöttét, mint a kooperáció és az erős kompetíció. Ezek a kölcsönhatások olyan fiziológiai és szabályozásbeli változásokhoz vezethetnek, amelyek hatására a jobban alkalmazkodó mutánsok fennmaradhatnak (Rendueles és Ghigo 2012). Ezek a kölcsönhatások ugyanakkor elősegíthetik bizonyos fajok bekapcsolódását vagy eltűnését a biofilmbe, így fontos szerepük van a kevert közösségek alakításában (Dubey és Ben-Yehuda 2011). Az eddigi kutatások nagy része arra fókuszált, hogy a fajok között kialakuló antagonizmus (toxintermelés, antimikrobiális anyagok) milyen formában befolyásolja a biofilmképzést. Frissebb eredmények azonban arra világítanak rá, hogy sok esetben a nem-biocid anyagoknak is fontos szerepe van a közösség kialakításában (Rendueles és Ghigo 2012).

### 2.2.1 A kevert közösségek kialakulását befolyásoló tényezők

A „felület betakarása” (surface blanketing) jelenséget *P. aeruginosa* és *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) között figyelték meg An és munkatársai 2006-ban. A *P. aeruginosa* mozgóképességének köszönhetően gyors kolonizálóként elszaporodott a felületeken, így meggátolta az *R. radiobacter* megtelepedését. A *P. aeruginosa* mozgásképtelen mutáns ezzel ellentétben képes volt kevert biofilmképzésre.

A felületaktív anyagok termelése gyakori a mikrobák körében és sok esetben gyengítik a baktérium-felület, illetve baktérium-baktérium közötti kölcsönhatásokat, így befolyásolva a biofilmek kialakulását. Például a *Pseudomonas* fajok putisolvin nevű lipopeptidje gátol más *Pseudomonas* fajokat (Kuiper et al. 2004). Az uropatogén, extraintesztinális *E. coli* egy nagy molekulatömegű poliszacharid révén (amely növeli a felület hidrofobicitását, és csökkenti a letapadást), gátolja számos G-pozitív és G-negatív baktérium biofilmképzését (Valle et al. 2006). Rendueles és Ghigo (2012) munkájából kiderül az is, hogy egy *E. coli* törzs által termelt, mannóz-gazdag poliszacharid gátolja a *Staphylococcus aureus* csatlakozását a már kialakult biofilmhez. A QS gátlásával is befolyásolható a biofilmképzés. Ugyanahhoz a fajhoz tartozó baktériumok képesek gátolni egymás kommunikációját azáltal, hogy olyan enzimeket termelnek, amelyek lebontják a QS jelmolekulákat (pl. AHL-laktonáz, AHL-aciláz) (Dong et al. 2002). Az extracelluláris poliszacharidokból kialakuló mátrix poliszacharid (adhezin degradáció, Kaplan et al. 2004), nukleinsav (Whitchurch et al. 2002) illetve fehérje (szerin proteáz termelés, Iwase et al. 2010) komponenseinek a gátlása is gyakori folyamat, amely a kevert tenyészetek kialakulását megakadályozhatja.

A kevert tenyészetek nemcsak baktériumok között, hanem baktérium és gomba között is kialakulnak. Egy alaposan tanulmányozott közösség a *Candida albicans* és *P. aeruginosa* által kialakított közösség, amely képes kolonizálni a cisztás fibrózisban szenvedő betegek tüdejét. A transzkripciós analízisek kimutatták, hogy a *C. albicans* megtapadását és biofilmképzését szabályozó gének alulszabályozottak ebben a közösségben (Gibson et al. 2009).

## 2.3 Biofilmek az élelmiszeriparban

Az élelmiszerek okozta megbetegedések gyakoribbak, mint gondolnánk. A World Health Organization (WHO) 2007-es felmérése alapján ez komoly gondokat okoz mind a fejlett, mind a fejlődő országokban.

Az élelmiszergyártásban komoly kihívást jelentenek a káros mikroorganizmusok, és az ellenük való védekezés (Kumar és Anand 1998). Az Egyesült Államokban évente több mint kilencezer ember hal meg ételmérgezésben, és több millióan fertőződnek meg élelmiszerekben található patogén mikroorganizmusokkal. Főleg a salátán előforduló *E. coli*, a málnán levő *Cyclospora cayetanensis*, illetve a paradicsomon levő *Salmonella* okozott leggyakrabban ételmérgezést az USA-ban. Európa nyugati részében évente a lakosság egyharmadát érinti valamilyen élelmiszer eredetű megbetegedés. 2011 májusában, Németországban *E. coli* O104:H4 által okozott járvány robbant ki, amelynek felelőse az előzetes vizsgálatok alapján a Spanyolországból importált uborka vagy az Észak-Németországban termelt paradicsom és saláta volt. Sok idő telt el ameddig kiderült, hogy a járvány valódi oka nem volt más, mint az Egyiptomból származó görögszéna-mag, amelyet csíráztatás után, mindenféle előkezelés nélkül azonnal elfogyasztottak. Az esetnek ötven halálos áldozata volt, és több mint háromezren betegedtek meg ([www.nébih.hu](http://www.nébih.hu)). Magyarországon a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) felmérései alapján 2008 és 2009-ben az igazolt ételmiszermérgezésben szenvedők száma meghaladta az ezer főt ([www.nébih.hu](http://www.nébih.hu)). Rendkívül fontos tehát a mikroorganizmusok túlélési stratégiáinak a megértése ahhoz, hogy csökkenthető legyen a fertőzések száma.

Az élelmiszergyárakban levő gépek felületén, a belső részekben, szállítószalagokon, késeken számos mikroorganizmus fordul elő akár planktonikus, vagy biofilm formájában és így a végtermék, amely a fogyasztókhöz kerül, könnyen keresztfertőződhet. Az első közlemény, amely megjelent e témában a *Salmonella* baktérium élelmiszerek felületén való megtapadásáról számolt be (Duguid et al. 1966). Azóta számos kutatás támasztotta alá, hogy a patogén mikrobák (pl.: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*) mellett az élelmiszerromlást okozók (pl.: *Pseudomonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta*) is gyakran jelen vannak (Røder et al. 2015; Giaouris et al. 2015). A biofilmeket alkotó sejtek sokkal ellenállóbbak, mint a szabadon úszók. Ez betudható annak, hogy a fertőtlenítőszer nehezen hatolnak át a vastag mátrixon, reagálhatnak az extracelluláris polimerekkel, illetve maga a sejtmorfológia olyan változásokat szenved (például receporok elvesztése), ami nem teszi lehetővé a fertőtlenítőszer molekuláinak bekapcsolódását (Van Houdt és Michielis 2010).

A megtapadt sejtek eltávolítására számos megközelítést teszteltek. Ilyen például a mechanikus dörzsölés, detergensok és enzimek alkalmazása (Kumar és Anand 1998). Ezen kezelések ellenére a teljes leválás gyakran nem következett be és a kezelés után is jelen voltak a biofilmeket kialakító sejtek. Pan és mtsai (2006) egy hidrogén-peroxid alapú

fertőtlenítővel próbálkoztak, de az hatástalannak bizonyult *L. monocytogenes* biofilmek eltávolításához, és a baktérium magas rezisztenciát mutatott kvaterner ammónium vegyületekkel szemben is.

Megfigyelték, hogy biofilmbe szerveződve a mikrobák képesek túlélni a hűtést, alacsony pH-t és a magas sótartalmat, valamint azt is, hogy az abiotikus felületek mellett a biotikus felületek is alkalmasak a megtapadásra. Így az *E. coli* marhahúson (Skandamis et al. 2009), *S. Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* és *L. monocytogenes* disznóbőrön tapadt meg (Morild et al. 2011). Foong és Dickson (2004) munkájából látható, hogy a *L. monocytogenes* egyfajos és kevert tenyészetei is képesek voltak megtapadni virslin, sonkán és sült marhahúson is. Ez növeli annak esélyét, hogy a fogyasztókhoz kerülő termékek, az óvintézkedések ellenére is szennyezettek legyenek. A szennyeződés a termék előállításának bármelyik lépésében megtörténhet és származhat a levegőből, a dolgozókról, vagy éppen a felhasznált eszközök felületéről. A folyamatot számos tényező befolyásolhatja, ilyen az élelmiszerek összetétele (zsírtartalom, nedvességtartalom), szerkezete (homogenitás, érdesség) és fiziko-kémiai tulajdonságai (hidrofób jelleg, felület töltése) (Giaouris et al. 2015).

Olyan környezetben, ahol az élelmiszerek csomagolása vagy elkészítése zajlik, a nedvességnek és tápanyagok jelenlétének köszönhetően nagyobb valószínűséggel jelennek meg mikroorganizmusok, mint máshol. Elsőként az ételekből származó szerves anyagok (például a tejből és húsokból származó fehérjék) rakódnak le a gépek felületére, majd a mikroorganizmusok kolonizálják a kondicionált felületet. A takarítást követően visszamaradt sejtek szaporodni kezdenek és kialakítják a háromdimenziós struktúrájú biofilmeket (Shi és Zhu 2009). Ez a folyamat nemcsak ipari körülmények között, hanem a háztartási kellékeken, például mosogatószivacson, vágódeszkán, és edénytörlőn is lejátszódhat (Rayner et al. 2004).

## **2.4 A biofilmképzés gátlása az élelmiszeriparban**

A hagyományos élelmiszeripari eljárások sokszor nem elegendőek a biofilmképzés gátlásához, a biofilm körül kialakult vastag mátrix miatt, amely védőréteggént hat és megakadályozza a vegyületek behatolását (Simões et al. 2010). Elegendő, ha a sejtek kevesebb, mint 1%-a visszamarad ahhoz, hogy a biofilm újra kialakuljon: ez akár néhány óra alatt megtörténhet (Simões et al. 2010). A ma rendelkezésre álló módszerek nagy része képes eltávolítani a szabadon úszó sejtek 90%-át, de nem pusztítja el őket. Sőt, ha a kezelés hatására aeroszokok keletkezhetnek, ez újabb felületekre juttathatja el a sejteket,

ahol szintén elindulhat a kolonizáció (Carpentier és Cerf 1993; Taormina és Beuchat 2002). A kezelések korlátozott hatékonysága miatt egy biofilm akár több éven keresztül is jelen lehet egy adott felületen (Hingston et al. 2013). Ez jelentősen befolyásolhatja a gyárakban dolgozók egészségét és a gyártásra kerülő termékek mikrobiológiai tisztaságát. Wang és mtsai (2013) felmérése alapján a *Salmonellával* fertőzött csirkehúsból és a szalmonellózisban szenvedő dolgozókból izolált törzsek azonosak voltak, és hasonló antibiotikum rezisztenciát mutattak ampicilinnel, trimetoprimmel, gentamicinnel, kloramfenikollal és tetraciklinnel szemben. Felületkezelésre leggyakrabban felületaktív anyagokat, savas vagy lúgos kémhatású tisztítószeret használnak, amelyek alkalmasak a felületeken visszamaradt szerves anyagok eltávolítására. A nátrium hipoklorit (da Silva et al. 2011), hidrogén peroxid (Toté et al. 2010), ózon (Tachikawa et al. 2009) és perecetsav (Frank et al. 2003) mind hatásosnak bizonyult a biofilmekkel szemben. A felsorolt anyagok alkalmazása azonban technikai és élelmiszerbiztonsági okokból nem mindig lehetséges és hatékonyságuk sem minden esetben kielégítő. (Srey et al. 2013).

A fentiek alapján is látszik, hogy gyakorlati igény van új megközelítések kidolgozására a hatékony biofilm eltávolításhoz. Megoldást nyújthat például az ultrahangos kezelés, enzimek, fágok, valamint ezek kombinált használata (Srey et al. 2013). Ezek mellett a sejtek közötti kommunikáció gátlása is hatékony eljárásnak bizonyult (Bai és Rai 2011). Egy további fertőtlenítési eljárás lehet növényekből kivont illóolajok használata. Az illóolajok és származékaik kutatása fellendült az elmúlt években, és számos kutatás született biofilm-ellenes hatásukkal kapcsolatosan (Chorionopoulos et al. 2008; Adukwu et al. 2012; Valeriano et al. 2012). Al-Adawi és mtsai (2016) illetve Srey és mtsai (2013) munkáiból tudjuk, hogy a felületeken megtapadt biofilmekből származó sejtek keresztszennyeződéssel könnyen átkerülhetnek a gyártásra kerülő élelmiszerekre. Ez is jelzi a probléma összetettségét, ugyanis nem elégséges a felületek fertőtlenítésére koncentrálni, a gyártás utáni eltarthatóság növelése is fontos szempont kell, hogy legyen.

## **2.5 A quorum sensing (QS) mechanizmusa**

Az érzékelés jelensége régóta ismert a mikrobiológiában. Ilyen például a kemotaxis, amely során a sejtek képesek az attraktánsok felé vagy a repellektől távol úszni, tehát a folyamat lényege az érzékelésre adott válaszreakció, ami a sejtmozgás (Wadhams és Armitage 2004).

A quorum az a minimális sejtsűrűség, ami szükséges az inger-válasz rendszer kialakulásához, a sensing pedig a folyamatot szabályozó jelmolekulák érzékelését jelenti

(Fuqua et al. 1994). Itt már kommunikációról beszélhetünk, ugyanis a sejtek az általuk és a környező sejtek által kibocsátott jelzéseket képesek érzékelni, és azokra reagálni. Ezen kommunikáció révén, oly módon befolyásolják környezetüket, ahogy önállóan nem lennének képesek. A folyamatosan termelt, majd egy megfelelő koncentrációnál érzékelt jelmolekulák hatására megváltozik a génkifejeződés, és kialakulnak specifikus válaszreakciók, például populáció sűrűségének érzékelése (Wang et al. 2007). Ezeket a jelmolekula-válaszreakció rendszereket használva hasonlatosan a többsejtű organizmusokhoz, a mikrobák képesek összehangolni bizonyos populációsztű viselkedési formákat (Waters and Bassler 2010).

Ezt a viselkedésformát először a *Vibrio fischeri* nevű baktériumnál figyelték meg, ahol a mechanizmus a biolumineszcenciáért felelős gének kifejeződését szabályozza (Wagner et al. 2003). A későbbiekben kiderült, hogy a mechanizmus jellemző mind a G-, mind a G-pozitív mikroorganizmusokra (Wagner et al. 2003). A két baktériumcsoport QS rendszerei alapvetően különböznek egymástól, elsősorban a szignálmolekulák természetét illetően. A G-negatív baktériumoknál a QS rendszerek szignálmolekulája az N-acil-homoszerin-laktonok (AHL) családjába tartozik, a G-pozitív baktériumok esetében pedig ezek egy szenzor-kináz/regulátor kétkomponensű szignál-transzdukciós rendszert használnak, ahol a jelmolekulák szerepét kis molekulatömegű oligopeptidek töltik be (Papp 2009). Mindkét csoportnál számos folyamat a QS rendszerek szabályozása alatt áll, ilyen a már említett bakteriális fénytermelés (biolumineszcencia), a virulencia-faktorok szintézise, az extracelluláris poliszacharidok termelése, a biofilmek képzése, másodlagos anyagcseretermékek termelése, kemotaxis és konjugáció (Papp 2009).

### 2.5.1 Gram-negatív baktériumok QS rendszere

Az AHL-alapú QS rendszerek kutatása néhány évtizede indult. A korábban említett *V. fischeri* baktérium általában szimbiótaként él a lumineszcenciára képes kurta farkú tintahalban (*Euprymna scolopes*). A lumineszcencia a zsákmányszerzésben és álcázásban játszik fontos szerepet, és a szimbiontája, azaz a baktérium maga a lumineszcencia forrása. A baktériumot laboratóriumban felszaporították, és azt figyelték meg, hogy fénykibocsátás csak magas sejtszám mellett történt. A vizsgálatok bebizonyították, hogy a lumineszcenciát egy aktivátor molekula felhalmozódása okozta. Molekuláris vonatkoztatásban az AHL szintáz AHL-t termel, amely kidiffundál a sejtől a környezetbe. Két fő alkotórészből áll, szintáz fehérjéből (LuxI), ami az autoinducer termeléséért felelős és receptor fehérjéből (LuxR), amely gének kifejeződését szabályozza. A LuxI szintetizálja az N-(3-oxo-

hexanoil)-L-homoszerin laktont, amely egy bizonyos koncentráció felett komplexet képez a LuxR proteinnel. Ez a LuxR egy palindrom szekvenciához kötődik (lux doboz) a DNS-en, amely a QS által szabályozott gének előtt helyezkedik el. A LuxR a lux dobozhoz kötődik az RNS polimerázt aktiválva, amely által a luciferáz enzim transzkripciója fokozódik, így létrejön a biolumineszcencia. A QS következtében növekszik az autoinducer szintáz expressziója, így több AHL keletkezik, ami felerősíti a QS hatást. A *V. fischeri* által termelt jelmolekulát 1981-ben izolálták és jellemezték először (Eberhardt et al. 1981).

### 2.5.2 Gram-pozitív baktériumok QS rendszere

A G-pozitív baktériumok módosult oligopeptidekkel kommunikálnak, ahol a receptorok kétkomponensű membránhoz kötött hisztidin kinázok. Hosszúságuk 5 és 34 aminosav közé esik. Ezek a peptidek nem képesek passzívan átdiffundálni a membránon, így aktív transzport révén jutnak a környezetbe, ahol sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódnak. Ezen folyamatok biokémiája még kevésbé ismert, de feltehetőleg posztranszlációsan módosult peptidek, amelyekhez lakton, tiolakton és izoprenil csoportok kapcsolódnak (Nakayama et al. 2001). Számos G-pozitív baktérium peptidek keverékét használja kommunikációra. Egy jó példája a peptid alapú QS-nek a *S. aureus* rendszere. Alacsony sejtszám mellett olyan fehérjék termelődnek, amelyek elősegítik a letapadást és felületi kolonizációt. Magas sejtszám esetében pedig toxintermelés, illetve specifikus proteázok termelése következik be, amelyek elősegítik a sejtek leválását és továbbterjedését. Ez a változás a génexpresszióban az *Agr* QS rendszernek köszönhető, ahol az autoinducer egy AIP (autoinducer peptid) (Bassler et al. 1994).

### 2.5.3 Gombák QS rendszere

Az első gomba QS rendszert a *C. albicans*-ban írták le. A gomba sarjadzó és fonalas formában is előfordul, illetve képes a biofilmképzésre. A két forma közötti átmenetet egy, a sejtek által termelt farnezol jelmolekula szabályozza (Hornby et al. 2001). A *Saccharomyces cerevisiae*-ben a feniletanol és triptofol aromás alkohol jelmolekulák sejtsűrűség függően indítják be és szabályozzák az álfonális növekedést (Chen et al. 2006).

### 2.5.4 Fajok közötti QS rendszerek

Az AHL és AIP alapú rendszerek mellett találtak egy új jelmolekulát is, amely a fajok közötti kommunikációt teszi lehetővé. Ez a jelmolekula a *Vibrio harveyi* tengeri



baktériumban található furanozil-bór-diészter, amelyet autoinducer-2-nek (AI2) neveztek el (Watters és Bassler 2005). A molekula prekursora a 4,5-hidroxi-2,3-pentándion (DPD), amelyet a LuxS protein állít elő S-adenozin-metioninből (Winzer et al. 2002). Ezt a jelmolekulát úgy a G-pozitív, mint G- baktérium csoportok is használják.

McAlester és mtsai (2008) és később Gibson és mtsai (2009) beszámolt a *C. albicans* és *P. aeruginosa* által alkotott közösség jelrendszeréről, amely szintén jó példája a fajok közötti QS folyamatoknak. A két faj képes kevert biofilmet létrehozni, amikor a *C. albicans* sarjadzó formában van. A *P. aeruginosa* által termelt AHL jelmolekula gátolja az élesztő hifa képzését, így a sejtek a biofilmképzésre alkalmas sarjadzó formában maradnak.

#### 2.5.5 A quorum érzékelés gátlása

A quorum kioltásra (*quorum quenching*, QQ) képes anyagokat lehetnek: AHL-acilázok, AHL-laktonázok, illetve egy nemrég felfedezett laktonáz csoport, amelyet a biofilmképzésért felelős *bpiB* gén kódol (Dong et al. 2000; Dong és Zhang 2005). Az első QS inhibitorokat a *Delisea pulchra* vörös algából izolálták, és azóta további hasonló anyag hatásáról szereztek tudomást.

A *Bacillus* fajok által termelt AiiA laktonáz egy univerzális AHL gátló. Képes lehasítani a lakton gyűrűt az acil csoportról, így képtelenné teszi a molekulát a szignál-transzdukcióra. Így gátolja a G-negatív baktériumok kommunikációját, de a sajátja háborítatlan marad (Dong et al. 2000 és 2001). A *P. aeruginosa* képes lebontani a hosszú szénláncú AHL jelmolekulákat egy AiiD típusú aciláz segítségével; a *Salmonella* Typhimurium és *E. coli* sejten belül felhalmozzák az AI-2-t, majd lebontják azt, ezáltal lecsökkentve a jelmolekula koncentrációját az extracelluláris térben, így nem indul el a kommunikáció (Huang et al. 2003; Xavier és Bassler 2005). Chorionopoulos és mtsai (2010) munkája alapján a *Hafnia alvei* (humán bélflóra tagja) által termelt metabolitok gátolták a *S. enterica* serovar Enteritidis PT4 biofilmképzését.

Számos szárazföldi növényből is vontak ki hasonló hatású anyagokat. Például Adonizio és mtsai egy 2006-ben végzett kutatásban ötven floridai gyógynövény illóolajának QS gátló hatását tesztelték *Chromobacterium violaceum* és *R. radiobacter* modellbaktériumokon, amelyeknek a színanyag termelése QS szabályozás alatt áll. Ezek közül sikerült 6 db hatékony QS gátló növényt találni. Ezek mellett a fahéjaldehid (fahéj illóolaj fő komponense) sikeresen gátolta a *P. aeruginosa* PAO1 biofilmképzését és a vérnarancsból kivont furokumarinok is hasonló hatást mutattak *E. coli* O157:H7,

*Salmonella* Typhimurium és *P. aeruginosa* esetében (Niu és Gilbert 2004; Girennavar et al. 2008).

Feltevődik a kérdés, hogy vajon jelentkezhet-e rezisztencia a QQ anyagokkal szemben? Eddigi kutatások alapján ennek az esélye csekély, ugyanis nem a szaporodás gátolódik, hanem a virulencia kialakulása, tehát nincs szelekciós nyomás (Defoirdt et al. 2010).

A QS működésének alaposabb megismerése fontos lenne elméleti és gyakorlati szempontból is; például hozzájárulhatna a biofilmet képző mikrobák okozta fertőzések hatékonyabb kivédéséhez (Wang et al. 2007). Új antimikrobiális szerek keresése során is kiemelt figyelmet kap az esetleges anti-QS hatás (Cos et al. 2006).

## 2.6 Illóolajok jellemzése

Az illóolajok levegőn könnyen elpárolgó, aromás, tömény hidrofób folyadékok, amelyeket általában vízgőz-desztillációval nyernek a különböző növényi részekből (pl. virágokból, gyümölcsökből, magvakból, virágbimbókból, levelekből, kéregből). Régóta használja őket a kozmetikai ipar, de az élelmiszeripar is, ahol főleg íz- és aromaanyagként kerülnek alkalmazásra. Régóta ismert, hogy bizonyos illóolajok baktérium-, gomba-, vírus- és parazitaellenes hatással is rendelkeznek. Valószínű a termelő növényekben is szerepük van a fertőzésekkel szembeni védekezésben (Song és mtsai 2010). Mindezek alapján intenzív kutatás folyik olyan növényi-eredetű anyagok azonosítására, amelyek nem toxikusak, de képesek gátolni patogén mikrobák szaporodását (Hentzer et al. 2003).

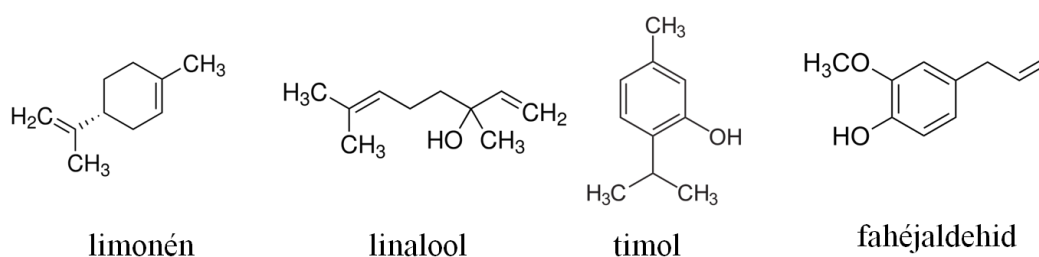
Az illóolajok alkalmazása történelmi távlatokkal bír. Például az egyiptomiak a halottaik balzsamozásához is felhasználták az illóolajokat. A kínai kultúrában is többféle aromás növényt használtak, és régóta alkalmazták a fahéjat, borsot és gyömbért járványok ellen (Bakkali et al. 2008).

Az illóolajok kémiaiilag komplex anyagok, számos fő és minor komponensből állnak; némely összetevő pedig csupán nyomokban fordul elő. A komponensek általában terpének és terpenoidok, mono- vagy szeszkviterpének, illetve di- és triterpének lehetnek. A terpénekon kívül további jelentős összetevők lehetnek a különböző alacsony molekulatömegű alifás és aromás vegyületek, például szénhidrogének, savak, alkoholok, aldehidek, laktonok és kéntartalmú illékony vegyületek (Bakkali et al. 2008).

A terpének több izoprén egységből álló szénhidrogének ( $C_6H_8$ ). A citoplazmában szintetizálódnak a mevalonsav-úton keresztül. A terpének nagy része monoterpén ( $C_{10}H_{16}$ ).

és szeszkviterpén (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>). Ide tartoznak például a limonén, terpinén, szabinén, pinén, p-cimén. Antimikrobiális hatásuk nem kiemelkedő. A terpenoidok olyan terpének, amelyek biokémiai módosuláson mennek keresztül. Bizonyos enzimek hozzáadnak a vázhoz egy O<sub>2</sub> molekulát, illetve hozzáadják, vagy eltávolítják a metilcsoportot. Ezek a változások jelentősen befolyásolják a hatásmechanizmusukat. Antimikrobiális hatásuk jelentős, a legjobb hatással bírók eddig a karvakrol és a timol, amelyek fenol csoportot és aromás gyűrűt tartalmazó monoterpenoidok.

A fenilpropének a fenilalaninból szintetizálódnak és csak kis részét képezik az illóolajoknak. Ide tartoznak például az eugenol, izoeugenol, fahéjaldehid, és a vanillin (1. ábra, Hyldgaard et al. 2012).



**1. ábra.** Néhány illóolaj összetevő szerkezete.

## 2.7 Illóolajok hatása baktériumokra

A növényi illóolajok antimikrobiális hatása régóta ismert, és ma is intenzíven kutatott terület. Nemcsak a gyógyászatban jelentenek kihívást, hanem az élelmiszeriparban is, ahol az élelmiszerek eltarthatóságának javítására a természetes eredetű anyagok, köztük az illóolajok, használata terjedőben van (Burt 2004). Leggyakrabban az agar diffúziós és tápoldatban történő hígítás (mikrodilúció) módszerével történnek a mérések. Ezen eljárásoknak hátulütője, hogy sok esetben az olajok könnyen elpárolognak, vagy be sem oldódnak a használt oldószerbe (Schelz et al. 2010).

Az illóolajok antibakteriális hatását intenzíven kutatják (Ahmed és Beg 2000; Niu és Gilbert 2004; Gutierrez et al. 2009; Rahman és Kang 2009; Angienda et al. 2010; Selim et al. 2014). Ezen kutatásokból levonható következtetés, hogy a G-pozitív baktériumok érzékenyebbek az illóolajok gátló hatására, mint a G-negatív baktériumok. A különbség valószínűleg az eltérő sejtfalszerkezetnek, illetve a G-negatív baktériumsejtfal külső

membránjának köszönhető, amely gátat jelenthet a hidrofób illóolaj komponensek számára (Burt 2004). A hidrofób komponensek beékelődhetnek a sejthártyába, megnövelve ennek átjárhatóságát. Ez a sejtben található anyagok kiáramlásához, illetve a fehérjék kicsapódását okozó illóolaj komponensek beáramlásához vezet (Burt 2004). A gombák esetében hasonló a hatás, itt is a sejthártya és sejtfal az elsődleges célpont. 2007-ben, Burt és munkatársai elsőként mutatták ki az illóolajok fehérjeszintézisre kifejtett hatásait. Olajok jelenlétében, az *E. coli* sejtek hősokk fehérjéket termeltek, illetve a flagellin szintézise gátolódott, ami mozgásképtelen sejteket eredményezett. A sejtekben zajló folyamatok optimális működéséhez a pH megfelelő szinten tartása elengedhetetlen. Az illóolajok felborítják a pH homeosztázist, ami az intracelluláris tér elsavasodását okozza (Faleiro 2011).

## **2.8 Illóolajok hatása élesztőgombákra**

A hatásmechanizmus hasonló, mint a baktériumoknál, az elsődleges célpont a sejtfal és a sejthártya. Rosato és mtsai (2008) közleménye szerint a teafa-, oregáno- és geránium-olaj szinergizmust mutatott az amfotericin B gombaellenes hatóanyaggal kórokozó *Candida* fajok ellen. Budzyńska és mtsai (2013) 16 illóolaj minimális gátló koncentrációját (MIC) és minimális fungicid koncentrációját (MFC) határozták meg *C. albicans* ATCC 10231 esetében, majd a legjobbnak bizonyult olajokkal klinikai izolátumokat is kezeltek. Az illóolajok hatékony gátlószereknek bizonyultak, illetve sikeresen csökkentették az oxidatív stresszel szembeni érzékenységet is.

Az ergoszterin a gombamembrán egyik fontos alkotója. Pinto és munkatársai (2006) kutatásából kiderült, hogy a kakukkfű (*Thymus pulegioides*) illóolájának hatására különböző *Candida* fajokban jelentősen csökkent az ergoszterin szintézise.

## **2.9 Illóolajok felhasználása élelmiszeripari termékekben**

Az újabb, hatékony fertőtlenítőszeres keresése az utóbbi időszakban fokozott figyelmet kapott. Egyebek mellett, a fűszer-, aroma- és gyógynövények illóolajaira terelődött a figyelem, ugyanis régóta használják őket az élelmiszeriparban aromaanyagokként. A magas fehérje- és zsírtartalom általában csökkenti az illóolajok hatását az élelmiszerekben: az illóolajok jól oldódnak az élelmiszer zsírtartalmában, így kevésbé érik el a vizes fázisban található baktériumokat. A fehérjék hidrofób részei, kölcsönhatásba lépve az illóolaj molekulákkal, megkötik azokat, így csökkentve a membránokra gyakorolt hatást

(Burt 2004). A közeg pH-ja is jelentősen befolyásolja az olajok hatását. Alacsony pH-n nő az olajok hidrofób jellege, így könnyebben beoldódhatnak a baktérium membrán lipid fázisába.

#### 2.9.1 Állati eredetű termékek

Eddig elsősorban a gyorsabban romló húsok (pl. darált hús, hal, és kolbász) eltarthatóságát vizsgálták. Vákuumcsomagolt friss polip eltarthatóságát is sikeresen megnövelték 11, illetve 20 nappal oregánó olaj alkalmazásával (Atrea et al. 2009). Levendula és menta illóolajokat tesztelve, sikerült gátolni az *E. coli* O157:H7 és *S. aureus* szaporodását *in vitro* és darált húsban egyaránt. A szerzők kiemelték, hogy a kezeléseket követően hosszabb ideig volt érezhető a friss hús illata (Djenane et al. 2012). Smith-Palmer és mtsai (2001) kutatásából tudjuk, hogy a magas zsírtartalom ellenére sajtok esetében 1% fahéjolaj hatékonyan gátolta a *Listeria monocytogenes* szaporodását. *L. monocytogenes*-el fertőzött nyers csirkemelleket kezeltek kitozánnal (gyakran használt élelmiszer-tartósítósó) és oregánó illóolajjal, amelyek hatására sikerült 6 nappal meghosszabbítani a hús eltarthatóságát (Khanjari et al. 2013). Ezekkel ellentétben, *in vitro* körülmények között jó hatást mutató korianderolaj, zselatinos borításban sonkán alkalmazva hatástalannak bizonyult *L. monocytogenes* szemben, és magasabb koncentrációk már negatívan befolyásolták a termék ízét (Gill et al. 2002).

#### 2.9.2 Növényi eredetű termékek

Élesztővel beoltott almabor zavarosodását a gyömbér illóolaj sikeresen gátolta (Liang 2003). Narancs-alapú, nem pasztörözött üdítőitalok esetében a citrál, linalool és  $\alpha$ -pinén megfelelő arányú kombinációja (enyhe hőkezeléssel kiegészítve) nagymértékben javította ezek eltarthatóságát (Belletti et al. 2010). Kiwi esetében a karvakrol és fahéjaldehid lemosó folyadékként alkalmazva bizonyultak hatékony romlást gátlóknak 0,15  $\mu$ l/ml koncentrációban (Roller és Seedhar 2002). Eukaliptusz, teafa, és szegfűszeg olajokat alkalmazva jelentős sejtszám csökkenést tapasztaltak mángoldok felületén, azonban az eltarthatósági időt nem sikerült növelni (Ponce et al. 2004).

#### 2.9.3 Jogi szabályozás

Az amerikai Food and Drug Administration (FDA), *Food additive* (FA; élelmiszer adalék) és *Generally Regarded As Safe* (GRAS; általánosan biztonságosnak tartott) státuszt adott az illóolajoknak. Európában eddig az illóolaj összetevőket regisztrálják, mint

ízesítőanyagokat, ilyenek például a karvakrol, timol, eugenol, citrál, limonén, mentol, fahéjaldehyd, karvon és a p-cimén (Burt 2004). A GRAS és az FA-lista jó kiindulópontot jelent, de egyelőre az Európai Unióban nincs érvényes szabályozás az illóolajok élelmiszerben való felhasználásáról (Burt 2004).

#### 2.9.4 Illóolajok citotoxikussága

Annak ellenére, hogy az illóolajok nagy részét GRAS és FA státusszal látták el, néhány kutatás rámutatott, hogy alapos vizsgálatok szükségesek citotoxikusságukat illetően. Stammati és mtsai (1999) kimutatták, hogy a fahéjaldehyd, timol illetve karvakrol nem károsak *in vitro* azonban *in vivo* körülmények között enyhe toxicitást mutattak. Néhány esettanulmány szerint egyes illóolajok és fő összetevőik allergiás bőrgyulladást váltottak ki olyan személyeknél, akik nagyon gyakran használták őket. Ezért megfelelő óvintézkedések javasoltak a gyárakban dolgozó személyzet esetében, de a mindennapi használat során is, ugyanis a bőrrel való érintkezésük tömény formában nem ajánlott (Bleasel et al. 2002; Burt, 2004). A szakirodalom szerint a karvakrol csökkentette a Hep-2 sejtvonal növekedését és DNS károsodást okozott a humán limfocitákban (Stammati et al. 1999; Aydin et al. 2005).

Az eugenol hatásáról számos kísérlet kimutatta, hogy gátolja a humán fogíny fibroblasztok életképességét (Fujisawa et al. 2003). Emellett viszont sikeresen gátolta a rákos sejtvonalak osztódását és beindította az apoptózist ezekben (Ghosh et al. 2004). Érdekes kísérletet végzett Irie és Keung (2003) amelyből kiderült, hogy az eugenol megvédte az agysejteket a béta-amiloid fehérjék káros hatásától *in vitro* és antidepresszáns hatást fejtett ki egerekben.

A fahéj (0,01%), szegfűszeg (0,01%), illóolajok és az eugenol (0,52 mM) nem mutattak citotoxikus hatást közepes koncentrációkban 1 órás inkubációt követően és a hosszabb inkubációs idő (24 óra) enyhén növelte az apoptotikus Caco-2 vékonybélsejtek számát. Ugyanakkor ebben a koncentrációban csökkentették az *E. coli* káros hatását is ezekre a sejtekre. Ezen kísérlet keretein belül arra a következtetésre jutottak, hogy ha a szervezetünkbe a megfelelő mennyiségű illóolaj kerül, ennek nem lesz káros hatása (Dušan et al. 2006). A pontos mennyiségek meghatározásához számos előkísérlet szükséges *in vitro* és *in vivo* egyaránt.

## 2.10 Felhasznált illóolajok bemutatása

### 2.10.1 Citrom

A citrom illóolaját hideg préseléssel állítják elő a gyümölcshéjből. Fő komponense a limonén, amely ciklikus, egyszerű szénhidrogén. Az olaj hatékonyabbnak bizonyult a G-pozitív baktériumok ellen, mint a G-negatívokkal szemben (Gupta et al. 2008; [www.aromax.hu](http://www.aromax.hu)). Tserennadmid és munkatársai (2011) szűrt és natúr almalevekhez adták hozzá az illóolajat és azt tapasztalták, hogy szűrt levekben az élesztők szaporodási rátái szignifikánsan csökkentek az illóolaj hatására, míg a natúr almalében a változás nem volt szignifikáns. Érzékszervi vizsgálatok alapján a termékek íze harmonikus volt a használt koncentrációk mellett.

### 2.10.2 Boróka

Az illóolajat az érett toboz bogyóiból vízgőz-desztillációval állítják elő. Főbb komponensei:  $\alpha$ -pinén,  $\beta$ -pinén, és szabinén (Pepeljnjak et al. 2005). A boróka illóolaj antibakteriális hatását több G-pozitív és G-negatív baktérium, valamint élesztőgombák és bőrgombák ellen vizsgálták (Pepeljnjak et al. 2005).

### 2.10.3 Fahéj

A babérfélék családjába (*Lauraceae*) tartozó fahéjfából nyerik ki, fő komponense a fahéjaldehid, (aromás vegyület), ezen kívül található benne eugenol,  $\alpha$ -, és  $\beta$ -kariofillén, linalool és  $\alpha$ -pinén. A fahéjot felhasználják zsíros bőrre készült samponokban, testápoló-, kézápoló szerekben. Hatékony gyulladáscsökkentő és gombaölő ([www.aromax.hu](http://www.aromax.hu)). Fungicid (Simić et al. 2004), antibakteriális és antikarcinogén (Unlu et al. 2010) valamint biofilmképzést gátló (Gupta et al. 2013) hatásával kapcsolatos publikációk ismertek.

### 2.10.4 Kakukkfű

A kakukkfű illóolajat a nálunk is termesztett kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris*) alsó, fás száraz nélküli virágzó hajtásaiból vízgőz-desztillációval nyerik ki. Az illóolaj színtelen, illata markáns, fűszeres, a fenolos alkotórésznek (timolnak) köszönhetően ([www.aromax.hu](http://www.aromax.hu)). Dél Franciaországban a *Th. vulgaris* populációk által termelt fő monoterpén komponensek alapján 6 kemovariánst különítettek el: geraniolos (G),  $\alpha$ -terpineolos (A), transz-szabinénhidrátos vagy tujanol-4-es (U), linaloolos (L), karvakrolis (C) és timolos (T) kemotípusokat. Csak Magyarországon nyolcféle kemotípusát

különböztették meg, melyek felében a timol és a germakrén-D volt főkomponens (Baráthné Simkó 2014). Kísérleteinkben a timolos kemotípust használtuk.

#### 2.10.5 Majoránna

A majoránna az árvacsalánfélék (*Lamiaceae*) családjába tartozó növényfaj. Felhasználható levesek, főzelékek, mártások, húsételek, és borok ízesítésére. Teáját fejfájás, köhögés és légzési zavarok enyhítésére használják (www.aromax.hu). A legnagyobb mennyiségben terpinén-4-olt tartalmaz, amely alkoholos vegyület (Gupta et al. 2008). Húsipari készítményekben (pl. nyers kolbász) növelte azok eltarthatóságát a termék ízének negatív befolyásolása nélkül (Busatta et al. 2008).

#### 2.10.6 Muskotályzsálya

A muskotályzsálya ugyancsak az árvacsalánfélék (*Lamiaceae*) családjába tartozó növényfaj. Dél-Európából származik, de már világszerte termesztik. Fő komponensei a linalil acetát és linalool. Jó antioxidáns és antimikrobiális hatást tulajdonítanak neki és frissebb adatok szerint jó szinergista és additív hatást mutat gyakran alkalmazott antibiotikumokkal (Gülçin 2004; Sienkiewicz et al. 2016).

### 2.11 A kísérlet során felhasznált mikroorganizmusok jellemzése

#### 2.11.1 *Bacillus cereus* var. *mycoides*

A *B. cereus* a *Bacillus* nemzetség egyik leggyakoribb faja. Endospórát képző, pálcika alakú, G-pozitív baktérium. Fakultatív anaerob, talajból gyakorlatilag szinte mindenhol izlálható. Mivel enterotoxint termel, egyes ételekben (rizs, húsfélék, tojás, burgonya) elszaporodva hasmenéssel és hányással járó ételmérgezést okozhat (Ehling-Schulz et al. 2004). Halállal járó ételmérgezés esetében is kimutatták már a baktérium jelenlétét, majonézes tézstasaláta fogyasztását követően (Dierick et al. 2005). Biofilmképzésre alkalmas törzs, amely képes gyorsan megtapadni például a zöld saláta felületén (Elhariry 2011).

#### 2.11.2 *Bacillus subtilis*

A *Bacillus* nemzetség másik fontos képviselője a *B. subtilis*. Endospórát képző, pálcika alakú, G-pozitív baktérium. Ritkán ételmérgezést is okozhat. Ez a baktérium felelős a kenyérnyúlósodásért, ilyenkor a termék belseje kenőcsös állományúvá válik és gyümölcs-észterre emlékeztető szagú lesz (Magyar Élelmiszerkönyv, 2-81).



### 2.11.3 *Escherichia coli*

Az *E. coli* az *Enterobacteriaceae* családba tartozó G-negatív baktérium. Az első géntechnológiai eredmények (plazmid izolálás és transzformáció) is ezzel a törzzsel születtek (Pesti 2001). Fakultatív anaerob, nem spórázó baktérium. A sejtek peritrich flagellumokkal mozognak, szabályos, egyenes rövid pálcika alakúak. A nem kórokozó törzsek melegvérű állatok normál bélflórájának tagjai, K2-vitamint termelnek (Bentley és Meganathan 1982). Élelmiszer-mikrobiológiai vizsgálatokban a fekáliás szennyeződés fő indikátora. Egy 2003-as esettanulmány szerint petrezselyem fogyasztását követően ételmérgezésre jellemző tünetek jelentkeztek a fogyasztóknál. Vizsgálatokat követően sikerült bebizonyítani az *E. coli* jelenlétét és szerepét a betegség kialakulásában (Naimi et al. 2003). Számos *E. coli* törzs kórokozó is lehet, mint például az enterohemorrágiás *E. coli* (EHEC) amely vérzéses bélgyulladást okoz. Az O157:H7 szerotípusa verotoxint termel és nem megfelelően hőkezelt húsokon fordulhat elő (Rodler 2005).

### 2.11.4 *Pseudomonas putida*

A *P. putida* egy G-negatív, pálcika alakú, szaprotróf baktérium a *Pseudomonadaceae* családból. Talajban és vízben fordul elő leggyakrabban. Bizonyos fajok szimbiózisban élnek növényekkel, ezért hasznos törzsnek számít biopeszticidek kifejlesztésében (Espinosa-Urgel et al. 2000). A leggyakoribb ízhibák okozói a *Pseudomonas* nemzetségbe tartoznak (*P. fragi*, *P. putida* és *P. fluorescens*). A pszichrotrófok általában proteolitikus romlást okoznak. Sok pszichrotróf baktérium képez lipázt, foszfolipázt, lecitinázt és más hidrolitikus enzimeket.

(<http://www.tankonyvtar.hu>)

### 2.11.5 *Pseudomonas fluorescens*

A *P. fluorescens* egy, a *Pseudomonadaceae* családba tartozó G-negatív, pálcika alakú, pszichrofil baktérium. Obligát aerob és talajban, vízben fordul elő leggyakrabban. Gyakran okozza húsok, zöltségek romlását és emellett hőstabil lipázokat és proteázokat termel, amelyek a tej megsavanyodását okozzák. Képes hűtött termékeken is elszaporodni és azok romlását előidézni (Madigan et al. 2003; Deák 2006).

#### 2.11.6 *Listeria monocytogenes*

Az *L. monocytogenes* G-pozitív, spórát nem képző, mozgékony, fakultatív anaerob, pálcika alakú baktérium a *Listeriaceae* családból. Kataláz-pozitív, oxidáz-negatív, a vörösvérsejtek pusztulását okozó béta-hemolizint termel (Farber és Peterkin 1991). Az *L. monocytogenes*-el való fertőzés okozza a liszteriózis nevű betegséget. Mivel gyakran fordul elő újszülöttek agyhártyagyulladásának kórokozójaként, a várandós anyáknak nem ajánlottak a lágy sajtok, hiszen ezek gyakran *L. monocytogenesszel* szennyezettek lehetnek (Genigeorgis et al. 1991). Akár 0°C-on is életképes, a hűtött ételekben is képes szaporodni. Hűtőgépekben, pl. 4 C környékén az elemi vas elősegíti az *L. monocytogenes* növekedését (Dykes és Dworaczek (2002). A legvirulensebb élelmiszer útján terjedő patogének egyike, a *Listeria*-fertőzések a klinikai esetek 20-30 százalékában halállal végződnek (Ramaswamy 2007). Olsen és munkatársai beszámolója alapján 2000-ben fertőzött pulykahús fogyasztását követően 4 elhalálozás és 3 spontán abortusz következett be az USA különböző államaiban *L. monocytogenesszel* való fertőzöttség miatt. A forrás a gyártó cég gyárában volt, az eset után több tonna húst visszavontak a piacról (Olsen et al. 2005).

#### 2.11.7 *Staphylococcus aureus*

A *S. aureus* egy G-pozitív baktérium a *Staphylococcaceae* családból. Egészséges emberek bőrén, orrnyálkahártyáján, székletében is megtalálható. Potenciális kórokozónak számít az enterotoxinok termelése miatt, amelyek számos esetben előfordultak élelmiszerekben is. Leggyakrabban a nyers, magas fehérjetartalmú ételek, mint a tejtermékek, húsok, saláták, töltelékes péksütemények kedveznek a baktérium szaporodásának (Hennekinne et al. 2012). Az European Food Safety Authority (EFSA) 2013-as felmérése alapján 2011-ben a *Staphylococcus*ok által termelt enterotoxinok okozták a legtöbb ételmérgezést az Európai Unióban (EFSA, 2013). do Carmo és munkatársai (2002) beszámolója alapján 1999-ben Braziliában két járvány is bekövetkezett *S. aureusal* fertőzött sajt és tejtermékek fogyasztását követően, amelynek során több mint hatszáz ember betegedett meg (do Carmo et al. 2002). 2014-ben egy keresztelőn felszolgált *S. aureussal* fertőzött fagylalt miatt a résztvevők nagy része ételmérgezést kapott (Fetsch et al. 2014).

#### 2.11.8 *Serratia marcescens*

A *S. marcescens* az *Enterobacteriaceae* családba tartozó, G-negatív, pálcika alakú baktérium. Szaprofita, opportunista patogén, fakultatív anaerob. Vörös színű pigmentet, prodigiosint termel. Humánpatogén, húgyúti, illetve légúti fertőzéseket okoz, ritkán

kenyérbetegséget is okoz. Megtalálható a szálló porban, fürdőszobában, talajban, trágyában (Pesti 2001). Kutatások szerint a prodigiosin nevű vörös pigment termelése QS szabályozás alatt áll (Van Houdt et al. 2007).

#### 2.11.9 *Pichia anomala*

A *Pichia* (*Hansenula* és *Hyphopichia*) nemzetség a *Saccharomycetaceae* családba (élesztőgombafélék) tartozik. A *P. anomala* széles körben elterjedt, izolálták már ételekből, rovarokból, szennyvízből, emberi szövetből és egyre több kutatásban használják fel modellszervezetként (Walker 2011). Gyümölcs- és zöldség-eredetű élelmiszerekben erjedéssel romlást okoz. Folyadékok felületén hártvaképzésre hajlamos.

#### 2.11.10 *Debaryomyces hansenii*

A *D. hansenii* a *Saccharomycetaceae* családba (élesztőgombafélék) tartozó faj. Ozmo-, halo- és xerotoleráns nem patogén, proteolitikus és lipolitikus enzimeket termel és tejtermékekben, sajtokban fordul elő a leggyakrabban (Fleet 1990; Seiler 1996; Breuer és Harms 2006). Korábban már kimutatták, hogy bár fontos szerepe van a sajtgyártásban a jellegzetes mikroflóra tagjaként, nagyon savas és alacsony víztartalmú termékek romlását okozhatja (Jakobsen és Narvhus 1996). Újabb kutatások azt mutatják, hogy olívbogyók esetében tagja lehet termékromlást okozó biofilm közösségeknek (Grounta et al. 2015).

#### 2.11.11 *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomycetaceae* családba tartozó pék- vagy sörélesztő, sejtjei oválisak, 5–10 mikrométer átmérőjűek. Ezzel a fajjal termelik a sör-, a bor-, a takarmányélesztőt, és a sütőélesztőt és ezt az élesztőt alkalmazzák leggyakrabban a fermentációs eljárásokban is. A gyümölcslevek erjeszthető cukrokban gazdagok, és alacsony pH-juk miatt romlásukat leggyakrabban *S. cerevisiae* okozhatja. Palackozott borok és sörök zavarosodását is gyakran okozhatja *S. cerevisiae* (Deák 2001; Aneja et al. 2014).

#### 2.11.12 *Chromobacterium violaceum* 85WT

A baktérium a *Neisseriaceae* családba tartozik, G-negatív, fakultatív anaerob és általában a trópusi és szubtrópusi régiók vizeinek és talajának normál flóráját alkotja (Kumar 2012). A violacein pigment termelése miatt, a kolóniák sötétlila színűek. A violacein ugyanakkor egy természetes antibiotikum is, amely hasznos lehet különböző ráktípusok kezelésében

(Kodach et al. 2006). A violacein termelése QS szabályozás alatt áll, ezért számos anti-QS hatást vizsgáló kutatásban használják modellszervezetként (McKlean et al. 1997).

#### 2.11.13 *Rhizobium radiobacter* NTL4 (pZLR4)

Az NTL4 törzs egy rekombináns plazmiddal rendelkezik (pZLR4) amely rezisztenciát biztosít a gentamicinnel szemben, így szelektálható. A környezetében levő AHL jelmolekulák a TraR fehérjéhez kapcsolódnak, aktiválják azt, majd a fehérje aktiválja a *traG* gént. Jelen esetben ez mutációt szenvedett a *lac Z* inszerció révén, ami a béta galaktozidáz gént kódolja. Így a törzs felhasználható az AHL jelmolekulák kimutatására, ugyanis a jelmolekula jelenléte kék elszíneződést eredményez a táptalajon azáltal, hogy a béta galaktozidáz lebontja az X-gal-t (Cha és mtsai 1998).

#### 2.11.14 *Chromobacterium violaceum* CV026

A *C. violaceum* törzset mini-Tn-5 transzpozon mutagenézisnek vetették alá így egy violacein-negatív, fehér mutánst kaptak, amely nem termeli a színanyagot, de érzékeli az AHL jelmolekula jelenlétét (McClellan et al. 1997).

#### 2.11.15 *Escherichia coli* JM 109 pSB 535 és pSB 1075

Az *E. coli* JM 109 pSB536 és pSB1075 esetében az AHL jelmolekulák jelenléte indukálja a törzsek lumineszcenciáját. A pSB536 a C4 míg a pSB1075 a 3-oxo-C12 hosszúságú AHL jelmolekulákat érzékeli (Winson et al. 1998).

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Az élelmiszerbiztonság napjainkban számos fontos kérdést vet fel és komoly kihívás elé állítja a gyártókat. A mikrobiológiai szennyeződés és a gyors romlás miatt nagy mennyiségű termék kerül kidobásra anélkül, hogy eljutna a fogyasztóig. Az óvintézkedések ellenére fennáll annak a veszélye is, hogy a háztartásokba kerülő termékek szennyezettek élelmiszerromlást okozó vagy patogén mikroorganizmusokkal. Ennek kiküszöbölése elsődleges cél az ipar számára. Ugyanakkor a mesterséges élelmiszer adalékanyagokkal szemben határozottan növekszik a fogyasztói ellenállás, illetve a rezisztens törzsek kialakulása is egyre komolyabb gondokat okoz. Egyértelművé vált, hogy olyan antimikrobiális szereket kell találni, amelyekkel szemben nem alakul ki rezisztencia, viszont képesek hatékonyan gátolni a mikrobák szaporodását. Mindezek mellett pedig az élelmiszeriparban használható, kellemes, a termékekkel harmonizáló íz és illat jellemzőkkel rendelkeznek.

A fentiek alapján, munkánk fő célja a kiválasztott növényi illóolajok és illóolaj összetevők antibiofilm és anti-QS hatásának vizsgálata volt élelmiszerromlást okozó, illetve patogén mikroorganizmusokkal szemben.

Munkánk elején a következő célokat fogalmaztuk meg:

- 1. Illóolajok és fő komponenseik élelmiszerrontó illetve kórokozó mikroorganizmusokra gyakorolt hatása: az antimikrobiális gátló hatás és a biofilmképzés gátlásának vizsgálata.**
- 2. A QS mechanizmus jelmolekuláinak kimutatása élelmiszerekről izolált törzsekből. Illóolajok és fő komponenseik hatása a QS mechanizmusra.**
- 3. Illóolajok felhasználhatóságának vizsgálata élelmiszerek (hús, gyümölcs, zöldség, gyümölcslé) mikrobiális romlásának megelőzésére.**

#### 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

##### 4.1 Tápközegek

Luria Bertani (LB) tápoldat:

10 g tripton; 10 g NaCl; 6,6 g élesztőkivonat; 1000 ml desztillált víz

Trypton-glükóz tápoldat (TGE):

10 g glükóz; 5 g tripton; 2,5 g élesztőkivonat

Malátás tápoldat (MEA):

50 ml maláta kivonat; 5 g élesztőkivonat; 5 g glükóz

Trypton-szója tápoldat (TSB):

17 g pepton kazein; 3 g szója pepton; 2,5 g glükóz; 5 g NaCl; 2,5 g  $K_2HPO_4$

Brillantzöld-laktóz-epe leves (BBL):

10 g tripton; 10 g laktóz; 20 g marhaepe; 2,7 ml 5%-os brillanszöld oldat.

Glicerines táptalaj *S. marcescens* tenyésztéséhez:

10 g húskivonat; 10 g bakto pepton; 10 ml glicerín

Autoinducer bioassay (AB) minimál táptalaj:

20 ml 20x foszfát törzsoldat; 20 ml 20x nitrogén só törzsoldat; 1 ml glükóz törzsoldat; 40 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-galaktopiranozid) – 400 ml desztillált vízben

20x Foszfát törzsoldat: 60 g  $K_2HPO_4$ ; 20 g  $NaH_2PO_4$

20x Nitrogén só törzsoldat: 20 g  $NH_4Cl$ ; 6 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 3 g  $KCl$ ; 0,2 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,05 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

Glükóz törzsoldat: 0,5% oldat desztillált vízben

Salmonella elődúsító:

10 g pepton kazein; 5 g NaCl; 9 g  $Na_2HPO_4$ ; 1,5 g  $KH_2PO_4$ .

Rappaport-Vassiliadis elődúsító:

5 g szója pepton; 8 g NaCl; 1,6 g  $KH_2PO_4$ ; 40 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0,04 g malachitzöld; pH=5,2±0,2

Trypton leves:

20 g tripton; 10 g NaCl; 2 g DL-triptofán.

Szelektív táptalajok:

Palcam szelektív agar (*L. monocytogenes* kimutatásához):

26 g peptonok; 10 g mannitol; 0,5 g glükóz; 1 g oldható keményítő; 15 g lítium klorid; 0,8 g eszkulin; 0,6 g vas(III)-ammónium-citrát; 0,08 g fenolvörös; 13 g agar, szelektív kiegészítő: 10 mg polimixin B; 5 mg akrilflavin hidroklorid; 20 mg ceftazidim,

Pseudomonas szelektív agar:

10 g savas hidrolizált kazein; 16 g zselatin pepton; 10 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,4 g MgCl; 11 g agar; 10 ml glicerol; szelektív kiegészítő: 25 mg cefalotin; 5 mg fucidin; 5 mg ceftrimid.

Baird Parker szelektív agar (*Staphylococcus* kimutatására):

10 g peptonok; 10 g Na-piruvát; 12 g glicin; 5 g lítium klorid; 17 g agar; szelektív kiegészítő: 60 ml steril tojássárga-tellurit emulzió.

E. coli szelektív agar:

20 g tripton; 1,5 g epesó; 0,075 g X-glucuronid; 0,1 g magenta-gal; 15 g agar.

## 4.2 Mikroorganizmusok

A felhasznált mikroorganizmusokat az 1. táblázat tartalmazza. A törzsek a Szegedi Tudományegyetem TTIK Mikrobiológiai Tanszékén működő Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteményből (SZMC; WDCM 987) származnak. A kísérleti tenyészetek fenntartása a megfelelő táptalajokon történt kéthavonkénti átoltással, és 4 °C-on történő tárolással.

### Izolálás

A zöldségeket (paprika, hónapos retek, paradicsom, fejes saláta) és salátakeverékeket (csomagolt saláta és a csírakeverék) helyi piacról, illetve üzletből szereztük be. Steril körülmények között 2 mm vastag szeleteket vágunk a zöldségekből, amelyeket LB táptalajra helyeztünk. A salátakeverék és csírakeverékek esetében saláta, illetve csíra darabot helyeztünk a táptalajra. Inkubációt követően (24 óra) a kinőtt telepekből többszöri átoltással tiszta tenyészeteket készítettünk.

A húsok esetében csirke-, illetve kacsamell felületét steril mintavevő pálcával átdörzsöltük, majd a pálcát 9 ml steril pepton vízbe (10 g pepton, 5 g NaCl, 1000 ml desztillált víz) helyeztük 30 percre. Az így kapott sejtszuszpenzióból ötlépcsős, tízszeres hígítási sortkészítettünk, minden hígítást kioltottunk LB táptalajra majd tiszta tenyészeteket készítettünk. Az izolátumokat Gram szerint festettük és meghatározásig a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény követelményei szerint tároltuk.

1. táblázat. A kísérletek során felhasznált laboratóriumi törzsek.

| Fajnév                                       | Szubsztrát/Izolálási hely             | Törzsgyűjtemény kódja (SZMC) |
|----------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>  | -/-                                   | 0042                         |
| <i>Bacillus subtilis</i>                     | -/-                                   | 0209                         |
| <i>Escherichia coli</i>                      | -/-                                   | 0582                         |
| <i>Pseudomonas putida</i>                    | -/-                                   | 291T                         |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>               | laskagomba termőtest/<br>Magyarország | 16106                        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                 | klinikai minta/<br>Magyarország       | 110007                       |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                | nyúl/ Egyesült<br>Királyság           | 21307                        |
| <i>Pichia anomala</i>                        | tejfölgyártás utáni<br>savó/ Mongólia | 8061Mo                       |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>                 | -/-                                   | 0349                         |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> 85WT        | -/Dr. Szegedi E.                      | 6269                         |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026       | mutáns/Dr. Szegedi E.                 | 6267                         |
| <i>Serratia marcescens</i>                   | -/-                                   | 0567                         |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> NTL4<br>(pZRL4) | mutáns/-                              | 21407                        |
| <i>E. coli</i> JM109                         | mutáns/-                              | 22676                        |
| <i>E. coli</i> JM109 pSB535                  | mutáns/-                              | 22677                        |
| <i>E. coli</i> JM109 pSB1075                 | mutáns/-                              | 22678                        |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>              | vad feketeribizli/<br>Mongólia        | MB-021                       |

#### 4.3 Baktériumtörzsek izolálása és meghatározása élelmiszerekről

##### Fajmeghatározás

A fajmeghatározás céljából a tiszta tenyészeteket 1 ml LB tápoldatba oltottuk Eppendorf csövekbe. A tenyészeteket 24 órát követően lecentrifugáltuk majd DNS-t vontunk ki belőlük. Ehhez 0,5 ml LETS puffert (0,1 M LiCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8, 0,5% SDS) mértünk a csövekbe, majd 1 percre kevertettük a mintákat. 0,5 ml fenol: kloroform: izoamil-alkohol (25:24:1) keveréket pipettáztuk a csövekbe majd újabb keverés és centrifugálás (10000 rpm) következett 10 percre. A felső fázist, a középső fázis



megzavarása nélkül átpipettáztuk egy újabb csőbe. Hozzáadtunk 0,6 ml abszolút etanolt, majd centrifugáltunk (10000 rpm, 10 perc). A felülúszót leöntöttük majd 0,6 ml 70% etanolt mértünk a csövekbe és ismét centrifugáltunk (10000 rpm, 10 perc). A felülúszó eltávolítását követően a mintákat szárítottuk (10 perc) és a kapott üledéket 50 µl steril desztillált vízbe felfuszpendáltuk.

A PCR reakcióhoz az EubF-534R primert használtuk (Eub 8F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 534R: ATTACCGCGGCTGCTGG). 25 µl reakcióelegyhez a következő összetevőket mértük: dNTP mix (2mM, Fermentas): 2,5 µl; puffer (10x DreamTaq puffer, 20 mM MgCl<sub>2</sub> tartalmaz, Thermo Scientific): 2,5 µl; primer (10x hígítás, töménység: 100 µM, Thermo Scientific): 0,625-0,625 µl; Taq (10x hígítás, DreamTaq DNA polymerase, 500 U, 5 U/ µl, Thermo Scientific): 0,05 µl; bidesztillált víz: 16,2 µl.

A reakció 25 µl végtérfigatban zajlott 23 µl reakcióelegy és 2 µl DNS minta összemérésével, a következő paraméterekkel:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| 94 °C – 2 perc  |        |
| 94 °C – 30 mp   | } 30 x |
| 51 °C – 45 mp   |        |
| 68 °C – 1 perc  |        |
| 68 °C – 10 perc |        |

A PCR terméket, etídium-bromidot (10 mg/ml törzsoldat desztillált vízben oldva) tartalmazó 2%-os agaróz gélen futtattuk 120 V feszültséggel 40-50 percen keresztül. Az agaróz gél és a futtatóelegy elkészítéséhez Tris-acetát-EDTA (TAE) puffert (40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) használtunk. A fragmenteket 100-1000 bp nagyságú molekulatömeg markerhez viszonyítottuk. 10 µl PCR terméket szekvenálásának vetettük alá a fajsztintú azonosítás céljából (SeqOmics Biotechnology). A szekvenciákat a „Finch TV” program segítségével jelenítettük meg. A szekvenciák elemzése a BLAST programok használatával, az NCBI (National Center for Biotechnology Information) nemzetközi adatbázisban történő kereséssel történt.

#### 4.4 A felhasznált illóolajok és illóolaj összetevők

Az alkalmazott növényi illóolajokat az Aromax Zrt-től (Budapest, Magyarország) szereztük be (2. táblázat). Az összetevők meghatározása a gyártó laboratóriumában az alábbi készülékekkel történt: Agilent GC 6850 Series II; MS 5975C VL MSD, Agilent 19091S-433E kolonna. Az illóolajok fő komponenseit a Sigma Aldrich (Magyarország) cégtől szereztük be (2. táblázat).

2. táblázat. A kísérletek során felhasznált illóolajok és összetevők.

| Növény neve                               | Növényrész*                                  | Felhasznált fő összetevő |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|
| Citrom ( <i>Citrus lemon</i> )            | Gyümölcshéj                                  | limonén                  |
| Boróka ( <i>Juniperus communis</i> )      | Tobozbogyó                                   | $\alpha$ -pinén          |
| Majoránna ( <i>Origanum marjorana</i> )   | Hajtás                                       | terpinén-4-ol            |
| Muskotályzsálya ( <i>Salvia sclarea</i> ) | Hajtás                                       | linalool                 |
| Fahéj ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )    | Ceyloni fahéjfa belső kérgéből               | fahéjaldehid             |
| Kakukkfű ( <i>Thymus vulgaris</i> )       | Vastagabb, fás szárak nélküli virágzó hajtás | timol                    |

\* a gyártó által megadott adatok alapján

Az illóolajokból 2015-ben újabb adagot rendeltünk a gyártótól nagyobb (40 ml) kiszerelésben. Ezen illóolajok összetételének meghatározását Dr. Böszörményi Andrea (Semmelweis Egyetem, Farmakognózia Intézet) végezte az alábbiak szerint: az analízis Agilent 6890N/5973N GC-MSD készülékkel, Supelco SLB-5MS kapilláris kolonnán (30 m  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0,25  $\mu$ m) történt. A kolonna hőmérséklete 60-250 °C között változott. A vivőgáz hélium, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc (37 cm/s) volt. A detektálás quadrupole tömegszelektív detektorral történt, elektronionizációs (70 eV), teljes scan módban. Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) segítségével értékelték ki. A kvantitatív azonosítás során a komponensek retenciós idejét és tömegspektrumait standardok és a NIST 02 könyvtár adataival hasonlította össze, a százalékos értékelést terület-normalizációval végezte el.

#### 4.5 Tenyésztési körülmények

A *Bacillus* törzseket és a *P. fluorescens*-t TGE, az *E. coli*, *S. aureus*, *S. marcescens*, *C. violaceum* 85 WT illetve *P. putida* LB, a *L. monocytogenes* TSB, a *P. anomala* és *D. hansenii* élesztőket pedig MEA tápközegben növesztettük. A tesztek során a *Bacillus*, *C. violaceum* baktériumokat és az élesztőket 30 °C-on, az *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* baktériumokat 37 °C-on, a *Pseudomonas* törzseket pedig 25 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A környezeti izolátumok mindegyikét LB tápoldatban növesztettük 30 °C-on.

A QS indikátor törzsek esetében a *C. violaceum* CV026 és *R. radiobacter* NTL4 (pZRL4) törzseket 30 °C, míg az *E. coli* JM 109-es törzseket 37 °C hőmérsékleten tenyésztettük.

#### 4.6 Antimikrobiális hatás és biofilmképzés gátlás vizsgálata

##### 4.6.1 Minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározása

A MIC értéknek azt a legkisebb illóolaj, vagy illóolaj komponens koncentrációt tekintettük, amely még megakadályozta az adott mikroorganizmus szaporodását. Ezen érték meghatározásához a törzseket a leírt tápközegben és hőmérsékleten tenyésztettük 96 cellás polisztirol mikrotiter lemezekben. Az illóolaj koncentrációtartomány 100-0,1 mg/ml közé esett és az illóolajok emulgeálásához 1%-os TWEEN 40-et adtunk az oldatokhoz. A mikroorganizmusok korai stacioner fázisban lévő  $10^5$ /ml sejtszámú szuszpenziójából 100 µl-t adtunk az illóolajos tápközegekhez, majd a tenyészeteket 24 órán át inkubáltuk. Az illóolajokat nem tartalmazó sejtsuszpenziós tápoldat szolgált pozitív kontrollként, és a sejtmentes, illóolajos tápoldat negatív kontrollként.

Ezt követően 600 nm-en mértük az abszorbanciát mikrotiterlap olvasókkal (ASYS Jupiter HD, ASYS Hitech; SPECTROstar Nano, BMG Labtech). Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol a pozitív kontroll abszorbanciájához képest  $\pm 10\%$ -ra csökkent értékeket mértünk. Az ennél nagyobb eltérést növekedésként értékeltük. Az illóolaj vagy illóolaj komponens, illetve szuszpenzió nélküli tápoldat (háttér) optikai denzitás értékét minden esetben kivontuk a kapott eredményből. A keresést minden illóolaj és komponens esetében három párhuzamos méréssel végeztük. A MIC értékek meghatározását minden új gyártási számmal rendelkező illóolaj tételnél megismételtük.

#### 4.6.2 Biofilmképzés gátlása

##### Biofilmek kialakítása és kezelése

A biofilmeket 96-cellás polisztirol mikrotiter lemezeken alakítottuk ki. Egy cellába 200  $\mu$ l  $10^8$ /ml sejtszámú, korai stacioner fázisban lévő sejtuszpenziót adtunk, és a lemezeket megfelelő hőmérsékleteken 4 órán keresztül mozgatás nélkül inkubáltuk, hogy elősegítsük a sejtek letapadását. Ezután a le nem tapadt sejteket fiziológiás sóoldattal (9 g NaCl, 1000 ml desztillált víz) kimostuk, és a letapadt sejtekhez hozzáadtuk az illóolajat vagy illóolaj komponenst MIC/2 koncentrációban tartalmazó megfelelő tápoldatokat. Ebben az esetben is az oldatok 1%-os TWEEN 40-et tartalmaztak. 24 órás inkubáció következett a megfelelő hőmérsékleten. Az illóolajokat nem tartalmazó sejtuszpenziós tápoldat szolgált pozitív kontrollként, és a sejtmentes, illóolajos tápoldat negatív kontrollként (háttér). A kezeléseket hat párhuzamos méréssel végeztük.

##### Biofilmképzés gátlásának vizsgálata kristályibolyával való festéssel

A 24 órát követően a le nem tapadt sejteket pipettával eltávolítottuk, majd a mikrotiter lapokat (a szabadon úszó sejtek eltávolítása céljából) fiziológiás sóoldattal többször átöblítettük. Minden mintahelyre 200  $\mu$ l 99%-os metanolt mértünk, hogy rögzítsük a sejteket, majd 15 perc után a metanolt eltávolítottuk, és a lemezeket szárítottuk. Ezután 200  $\mu$ l 0,1%-os kristályibolya oldatot mértünk a cellákba. 20 perc inkubálás után a felesleges festéket vízzel lemostuk. Végül a biofilmekhez kötődött festéket 150-150  $\mu$ l 33%-os ecetsavval kioldottuk és 590 nm-en abszorbanciát mértünk. A kristályibolya kapcsolódik a biofilmek extracelluláris mátrixán belüli negatív töltésű felületi molekulákhoz és poliszacharidokhoz és így lehetővé teszi a biofilm teljes biomasszájának becslését a mikrotiter lap cellájában (Peeters et al. 2008).

##### Kevert mikrobiális biofilmek kialakítása és kezelése

A kevert tenyészetes kísérletekben *L. monocytogenes*/*P. putida*, *L. monocytogenes*/*E. coli*, *L. monocytogenes*/*S. aureus*, és *E. coli*/*P. putida* kombinációkat teszteltünk.

A sejtszám beállítása esetében figyelembe vettük az antagonizmus lehetőségét. Ennek tesztelése érdekében 1:1 arányban kevertük össze a tenyészeteket  $10^5$ ,  $10^4$  és  $10^3$  sejtszámok mellett. Egy napos inkubációt követően a mikrobáknak megfelelő szelektív táptalajokra szélesztettük a hígított tenyészeteket és telepeket számoltunk. Az optimális

kezdő sejtszám (ahol még nem gátolják egymás növekedését),  $10^3$  TKE/ml volt a *Listeria-E. coli*, illetve  $10^5$  TKE/ml volt a *Listeria-Staphylococcus* és a *Listeria-Pseudomonas* párosítások esetében.

Előzetesen megvizsgáltuk azt is, hogy a használt tápközeg összetétele befolyásolja-e eredményeinket. Mivel nem észleltünk szignifikáns eltérést az LB és TSB között, a továbbiakban a tápanyagokban gazdagabb TSB tápoldatot használtuk a kevert tenyészetek kialakításához. A megfelelő sejtszám beállítása után a kevert baktériumközösségeket  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk 1 napig. A biofilmképzés előtt – a megfelelő szelektív táptalajok segítségével - meghatároztuk az egyes baktériumok sejtszámát és arányát a közösségen belül, majd a **4.6.2 fejezetben** leírtak szerint történt a biofilmképzés. Az illóolajok koncentrációját a kevert tenyészetek egyes tagjaira megállapított MIC értékek figyelembe vételével alakítottuk ki a következő tartományban: MIC/4, MIC/2, MIC, és 2 MIC. Újabb 24 órás inkubációt követően ellenőriztük a kezelt tenyészetek sejtszámát. A letapadt biofilmeket mechanikusan kaparással és ultrahanggal távolítottuk el a mikrotiterlap faláról és hígítást követően szélesztést végeztünk a megfelelő szelektív táptalajokra a kezelt, és a kontroll mintákból. A biofilmek festése a **4.4.2 fejezetben** leírtak szerint történt.

#### 4.6.3 Biofilmképzés gátlás vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével

Az alkalmazott tápoldatok és tenyésztési körülmények megegyeznek a **4.1** és **4.5** fejezetben leírtakkal és a minták előkészítése is hasonló volt. A biofilmeket zsírtalanított fedőlemezekre alakítottuk ki: 5 ml 24 órás,  $10^8$  TKE/ml sejtszuszpenziót pipettáztunk a 6 lyukú mikrotiter lemezekbe helyezett fedőlemezekre, amelyek tapadási felületként szolgáltak a sejtek számára. A kevert tenyészetek esetében a **4.6.2 alfejezetben** említett sejtszám arányokkal dolgoztunk. Négyórás tapadást követően a lemezeket átmostuk fiziológiás sóoldattal, majd az előző kísérletekben hatásosnak bizonyuló illóolajokat alkalmaztuk gátlószerként MIC/2 koncentrációban. Pozitív kontrollként kezeletlen mintákat használtunk, ahol tápoldattal fedtük be a tárgylemezeket. 24 órát követően a tápoldatokat eltávolítottuk, fiziológiás sóoldatos mosás következett, majd előkészítettük a mintákat a SEM protokollnak megfelelően. A mintákat a biofilm rögzítése céljából 2,5% glutáraldehidben szobahőmérsékleten 2 órát inkubáltuk, majd 50%, 70%, 80%, 90% és 100%-os etanollal 2x15 perces időtartamokban víztelenítettünk. A fedőlemezeket ezután tercier butil alkohol: abszolút etanol 1:2, 1:1, 2:1 arányú keverékébe, majd 100%-os tercier butil alkoholba helyeztük 1-1 órára, szobahőmérsékleten. A mintákat végül tömény tercier

butil alkoholban 4 °C-on fagyasztottuk, és egy éjszakán át fagyasztva szárítottuk. A mintákat rögzítettük, majd a szükséges aranyréteg felvitelét követően (Quorum Technologies SC 7620 'Mini') a mintákat Hitachi S4700 pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

## 4.7 A QS mechanizmus vizsgálata

### 4.7.1 QS jelmolekulák jelenlétének kimutatása

A jelmolekulák kimutatása négy indikátor törzs segítségével történt. Az *R. radiobacter* NTL4 (pZLR4) a C6-C12 szénlánc hosszúságú AHL jelmolekulákat képes felismerni, míg a *C. violaceum* 026 a C4-C6 hosszúságúakat.

Az *R. radiobacter* NTL4 (pZLR4) esetében az indikátor törzset 30 mg/l gentamicinnel kiegészített AB tápoldatban tenyésztettük (120 rpm, 28 °C). Pozitív kontrollként az *R. radiobacter* AT6 törzset használtuk, amelyet hasonló körülmények között tenyésztettünk az antibiotikum elhagyásával. Petri csészékbe 10-10 ml X-gal-t (40 µg/ml) és 2% agart tartalmazó AB táptalajt öntöttünk. A csészéket két csoportra osztottuk, egy részük kontrollként szolgált: itt az AB táptalajra 10-10 ml 0,7% agartartalmú, X-galt tartalmazó AB táptalajt öntöttünk. A másik adagra 10 ml 0,7% agartartalmú, X-galt és az NTL4 (pZLR4) indikátor törzset tartalmazó táptalaj került. A táptalajokra a vizsgálni kívánt izolátumok 24 órás tenyészeinek ( $10^8$  TKE/ml) felülúszójából (5000 g, 15 perc) 60 µl pipettáztunk a dugófúróval kivágott lyukakba (átmérő: 6 mm). A csészéket 24 óráig, 28 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A kék elszíneződés jelezte az X-gal hidrolízisét és az AHL jelenlétét.

Hasonlóan jártunk el a *C. violaceum* 026 mutáns esetében, amely a rövidebb szénláncú (C4-C6) AHL jelmolekulákat érzékeli. Jelen esetben a tápközeg kanamicinnel (25 µg/ml) kiegészített LB volt.

Az *E. coli* JM 109 pSB 535 és *E. coli* JM 109 pSB 1075 törzsek esetében az AHL jelmolekulák jelenléte lumineszcencia kibocsátását váltja ki. A törzseket LB tápoldatban ampicillin (100 µg/ml) jelenlétében növesztettük (37 °C, 24 óra). A tízszeresére hígított tenyészetekből 100 µl-t pipettáztunk fehér mikrotiterlapokra (VWR). Ezekhez 100 µl vizsgálni kívánt szuszpenzió steril felülúszóját adtuk, majd 7 órás inkubációt követően mikrotiterlap olvasóval (FLUOstart OPTIMA, illetve SPECTROstar Nano; BMG Labtech) lumineszcenciát és abszorbanciát (450 nm) mértünk. Pozitív kontrollként AHL standardokkal (1 µg/ml N-dodecanoil-DL-homoszerin lakton, illetve N-butilil-DL-

homoszerin lakton; Sigma Aldrich) kiegészített 100 µl tápoldathoz adtunk 100 µl indikátor törzset. Negatív kontrollként AHL standardot nem tartalmazó tápoldattal kiegészített indikátor törzs szolgált. A kapott értékeket relatív lumineszcencia/abszorbancia 450 nm (RLU/OD<sub>450nm</sub>)-ban adtuk meg. Az indukált biolumineszcenciát a relatív indukált AHL mennyiségével fejeztük ki, amelyet a RLU/OD<sub>450nm</sub> rátájaként számoltunk ki a negatív kontrollhoz viszonyítva.

Az AI-2 jelmolekulák kimutatásához a Wattanavanitchakorn és munkatársai (2014) módszerét alkalmaztuk. A törzsek sejtmentes felülúszóihoz 1 ml reagenst adtunk, amely 50 ml 10 mM 1,10 fenantrolin oldat (pH 2) és 50 ml 3,32 mM Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> oldat keverékéből állt. Egy perc inkubálás után a kapott elegyet desztillált vízhez adtuk 5 ml végtérfogatban. Sterilre szűrtük (0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn), majd 3 percen belül lemértük a minták abszorpciós spektrumát. Pozitív kontrollként tápoldatba kevert 20 µM aszkorbinsav és negatív kontrollként maga a tápoldat szolgált. A reakció alapelve, hogy az AI-2 jelmolekula szerkezete az aszkorbinsavéhoz hasonlít. Az AI-2 redukálja a Fe(III) és a keletkező Fe(II) pedig kapcsolódik a fenantrolinhoz és a keletkező [(o-fen)<sub>3</sub>Fe]SO<sub>4</sub> narancssárga-piros színt eredményez, ami spektrofotometriásan mérhető. A folyamat az alábbi reakcióegyenleten alapul:



#### 4.7.2 Anti-QS hatás vizsgálata szilárd és folyadéktenyészetekben

##### Anti-QS hatás kimutatása papírkorong diffúziós módszerrel

Előzőleg *C. violaceum* 85 WT törzzsel leoltott és beszáritott LB táptalajt tartalmazó Petri csészékre 6-8 mm átmérőjű steril szűrőpapír korongokat helyeztünk. Ezekre a 1-3 µl tömény illóolajat vagy komponenst vittünk fel. A fahéjolajból és a fahéjaldehidből (erőteljes antimikrobiális hatásuk miatt) 1/2-es, valamint 1/4-es hígításokat (LB + 1% Tween 40) alkalmaztunk. A kristályos timolt 96%-os etanolban oldottuk. A 100 mg/ml törzsoldatból tízszeres hígítást készítettünk és ezt, valamint a törzsoldatot is rápipettáztuk a korongokra a fentebb említett mennyiségekben. Desztillált vízzel átitatott papírkorong szolgált kontrollként. A papírkorongok körül általában két körkörös zóna alakul ki: a belső zónában nincs növekedés, míg a külső zónában a baktérium növekszik, de színtelen. A depigmentáltság okozta színtelen zónákat mértük (mm), ugyanis a baktérium színanyag

termelése QS szabályozás alatt áll. A kezeléseket három párhuzamos mérésel végeztük. Hasonlóan jártunk el a *S. marcescens* esetében is, ahol a tápközeg glicerines táptalaj volt.

#### Anti-QS hatás kimutatása folyadéktenyészetben

A violacein és prodigiosin pigmentek termelődésének gátlását mennyiségi mérésekkel is kimutattuk. 10 ml LB tápoldatot használva különböző koncentrációjú (0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5%) illóolaj oldatokat készítettünk, amelyeket beoltottunk  $10^6$  sejtszámú 48 órás *C. violaceum* 85 WT vagy *S. marcescens* szuszpenzióval. 24 órás 30 °C-on végzett rázatást követően 2 ml mintát lecentrifugáltunk (12 000 rpm 20 perc; Heraeus Pico 17 centrifuga), a felülúszót leöntöttük és az üledékhez 2 ml DMSO-t (*C. violaceum* esetében), vagy 600 µl acetont és 200 µl citrátot (*S. marcescens* esetében) adtunk. A mintákat 10 percig vortexeltük, állni hagytuk 5 percig, majd újabb 10 perces keverés következett. Centrifugálást (12 000 rpm, 20 perc) követően lemértük a felülúszó abszorbanciáját (*S. marcescens*: 535 nm; *C. violaceum*: 585 nm). A minták sejtszámát (TKE/ml) is meghatároztuk a megfelelő táptalajra való szélesztéssel.

Negatív kontrollként az oldószert, míg pozitív kontrollként illóolajmentes mintát használtunk.

Fontos megemlíteni, hogy *S. marcescens* esetében 0,3% agar-agar hozzáadásával tudtuk indukálni a pigment-termelést.

#### 4.7.3 A QS gátlás és biofilmképzés gátlás közti összefüggés vizsgálata

A biofilmképzés és a QS mechanizmus közötti kapcsolat hátterének feltárása érdekében, megvizsgáltuk a *C. violaceum* 85 WT törzs biofilmképzését és pigmenttermelését illóolajok jelenlétében. A törzset 20 ml LB tápoldatban tenyésztettük 30 °C-on, rázatás mellett 24 óráig.

A biofilmképzés a 4.6.2 fejezetben leírtak szerint történt, néhány módosítással. A mintákat két csoportra osztottuk: a *nem előkezelt* csoport esetében négy órás letapadási folyamat történt (200 µl sejtsuszpenzió  $10^8$  TKE/ml sejtszámmal/ cella). Az *előkezelt csoport* esetében a négy órás tapadásnál már hozzáadtuk az illóolajokat/komponenseket QS gátló koncentrációban (150 µl  $10^8$  TKE/ml sejtsuszpenzió + 50 µl illóolajos oldat). A koncentrációk a folyadéktenyészetekkel végzett munka során meghatározott értékek voltak.



Négy óra elteltével mindkét csoportnál a le nem tapadt sejteket fiziológiás sóoldattal kimostuk, majd QS gátló koncentrációban hozzáadtuk az elkészített illóolaj/illóolaj komponens oldatokat. A kontroll minták csak tápoldatot tartalmaztak. 24 órás inkubációt követően a felülúszókból a 4.7.2 alfejezetben leírtak szerint kivontuk és megmértük a violacein mennyiségét. A kialakult biofilmeket kristályibolyával festettük és meghatároztuk a biofilmképzés mértékét. A minták három párhuzamos méréssel készültek.

#### 4.8 Illóolajok hatása élelmiszereken

##### 4.8.1 Nyers csirkehúson kialakuló *L. monocytogenes* biofilmek eltávolítása illóolajos páclevekkel

###### Előkezelés és pácolás

A friss, bőrmentes csirkemelleket a helyi piacról szereztük be. Az élelmiszerbiztonsági hatóságok nem javasolják a nyers baromfiáhusok mosását elkészítés előtt. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, szükséges-e ez a mosási lépés két vizsgálati csoportot alakítottunk ki a steril körülmények között 1 x 5 x 5 cm méretűre felvágott hússal: nem mosott (NM) és mosott minták (MM). A mosást csapvízzel végeztük. Az előkezelést követően a fölösleges folyadékot steril törölpapírral itattuk le a húsokról és a húskockákat steril polipropilén dobozokba (Minipak) helyeztük. A dobozok előzetes sterilizése klóros vizes (1000 ppm) atmoszárral és 30 perces UV alatti szárítással történt.

A húskockákat 24 órás *L. monocytogenes* szuszpenzióval oltottuk be: 100 µl szuszpenziót ( $10^4$  TKE, amely  $10^2$  TKE/cm<sup>2</sup> felel meg) pipettáztunk a kockák felületére és a folyadékot egy szélesztőbottal szétszattuk. A sejtszámot a nyers baromfiúsokra vonatkozó európai jogszabályban megengedett maximális sejtszámmal igazítottuk (2073/2005 EK rendelet). A mintákat hűtőszekrényben ( $6 \pm 1$  °C) 24 órán keresztül inkubáltuk.

Három páclevet készítettünk, amelyek összetétele a következő volt: 5% só (NaCl) és az illóolajok vagy timol MIC/2 koncentrációban (majoránna: 2 mg/ml; kakukkfű: 1 mg/ml; timol: 0,25 mg/ml). A timolt először 500 µl 96%-os etanolban oldottuk fel. A timolból készült oldatot és az illóolajokat a kimért sóra pipettáztuk és beoldottuk a steril desztillált vízbe. A pácleveket az előkezelt hússokra öntöttük úgy, hogy a húskockákat teljesen elfedje. A kontrollként szolgáló minták csak 5% sót tartalmaztak. A mintákat 24 és 48 óráig hűtőszekrényben tároltuk ( $6 \pm 1$  °C).

### A húsok mikrobiológiai vizsgálata

A húsok természetes mikroba közösségének vizsgálatához mintát vettünk steril mintavevő pálcákkal a friss, kezeletlen húsok felszínéről. A pálcákat 9 ml pepton vízbe helyeztük, a páclevek vizsgálatához 1 ml páclevetadtunk 9 ml pepton vízhez. Hasonlóan jártunk el a kezelt minták esetében is, és mintát vettünk a páclevekből is. Az összes sejtszám meghatározásához LB agart, a coliform baktériumok jelenlétének és számának meghatározásához BBL tápoldatot használtunk. Az *E. coli* sejtszám meghatározása triptonos tápoldatban történt, a pozitív csövekben indoltermelés volt megfigyelhető Kovács reagens hatására (piros gyűrű a folyadék felszínén). *Salmonella* jelenlétét több lépésben határoztuk meg. Első körben 25 g kezeletlen húst 25 ml elődúsító folyadékba helyeztünk és 37 °C-on inkubáltuk. Ha a folyadék zavarossá vált, 10 ml-t Rappaport elődúsító oldatba oltottunk. Amennyiben az oldat 24 órát követően zöld színűről sárgára váltott, oltókacccsal Rambach szelektív agarra (papton és élesztőkivonat: 8 g/L; kromogén és szelektív keverék: 2,7 g/L; agar: 20 g/L; szelektív kiegészítő: propilén-glikol: 10 ml/L) oltottunk ritkító szélesztéssel, ahol a szoliter tenyészetek bíborvörös színűek lesznek *Salmonella* jelenlétében. *S. aureus* jelenlétét Baird Parker, míg a *Listeria monocytogenes*-t Palcam szelektív agaron mutattuk ki.

### Érzékszervi vizsgálatok

A pácolt, nem fertőzött húskockákat napraforgó olajban megsütöttük és egy hattagú bíráló bizottságot kértünk fel, hogy értékeljék a minták külső megjelenését, ízét és illatát. A minták paramétereit egy tetszési skála osztályzata alapján sorolták be 1-től 5-ig ahol az 1 a legrosszabb, míg az 5 a legjobb mintának felelt meg. Az elfogadhatósági határt 3-ra állítottuk be és a vizsgálatokat két párhuzamos értékelés során végeztük el.

#### *4.8.2 Földieper eltarthatóságának növelése illóolajos gőztér segítségével*

A vizsgálatok során, a helyi piacon vásárolt El santa fajtájú földiepret használtuk.

A dobozok előzetes sterilizése klóros vizes (1000 ppm) atmoszással és 30 perces UV alatti szárítással történt. Szűrőpapírból 1 cm átmérőjű korongokat vágunk, majd a steril korongokat egy leégetett csipesz és 2% agar segítségével az edények tetejére rögzítettük. A korongokat 10, 20, 40 µl tömény citrom illóolajjal itattuk át. A kontroll csoportnál steril desztillált vizet használtunk. Három párhuzamos edényt készítettünk és minden edénybe 10 darab ép eperszemet helyeztünk. Az edényeket lezártuk és hűtőszekrényben tároltuk a

mintákat (6- 8 °C). Ezekkel a mintákkal párhuzamosan készült egy olyan sorozat is, amelyből 24 óra után eltávolítottuk az illóolajos korongot. Steril dugófúró segítségével 3 db lyukat fúrtunk a tároló edények tetejére, hogy a keletkező vízpárát eltávolítsuk. A lyukakat szűrőpapír darabbal lefedtük, amit 2% agarral rögzítettünk. A szűrőpapíron keresztül a vízpára eltávozhat, illetve a papír felszívja, de a gombaspórák a környező levegőből kint maradnak. A mintákat 13 napon át megfigyelés alatt tartottuk, és a szemmel láthatóan penészes eprek számát feljegyeztük. A romlott eperszemek számából a romlást százalékban adtuk meg.

#### Érzékszervi vizsgálatok

A földieper minták illatát, ízét, küllemét, és az illóolajjal alkotott ízharmoniót egy hattagú bíráló bizottság értékelte. A vizsgálat az 1. illetve 7. napos mintákból a **4.8.1 alfejezetben** leírtak szerint történt.

#### *4.8.3 Koktélpáradicsom eltarthatóságának növelése illóolajos gőztér segítségével*

A vizsgálatokhoz egy helyi nagyáruházból vásárolt koktélpáradicsomokat használtuk, amelyeket (mosás nélkül) félliteres steril műanyag dobozokba (Minipak) helyeztünk el. Ügyeltünk arra, hogy ne legyen köztük sérült vagy fertőzött bogyó. A dobozok sterilizése a korábban említett módon történt.

Mindegyik dobozba 5 db koktélpáradicsom került. A dobozok tetejére 1 cm átmérőjű steril szűrőpapírt ragasztottunk 2% agar segítségével. 20 µl illetve 10 µl kakukkfű illóolajat pipettáztunk a korongokra, a kontroll esetében pedig az olaj helyett steril desztillált vizet használtunk. Az edényeket lezártuk és 24 órára hűtőbe (6-8 °C) helyeztük.

24 óra elteltével minden dobozból eltávolítottuk az olajos korongokat. Ebben az esetben is biztosítottuk a vízpára eltávozását a fentebb leírt módon. A tároló edényeket visszahelyeztük a hűtőszekrénybe és 55 napon keresztül 3-5 naponta megfigyeltük a változásokat, a szemmel láthatóan penészes vagy barnult bogyók számát feljegyeztük. A romlott szemek számából a romlást százalékban adtuk meg.

#### Érzékszervi vizsgálatok

A kísérlet végén a minták illatát, eredeti ízét, küllemét, és az illóolajjal alkotott ízharmoniót egy hattagú bizottság értékelte. A minták kiértékelése a **4.8.1 alfejezetben** leírtak szerint történt.

#### 4.8.4 Gyümölcslevek eltarthatóságának növelése illóolajok segítségével

A vizsgálatokhoz kétféle gyümölcslevet használtunk. Egyrészt egy kereskedelmi terméket („100%-os pasztörözött és szűrt szőlőlé”, Tesco, Magyarország), másrészt a helyi piacról származó Irsai Olivér borszőlőből frissen készített mustot. Ebben az esetben a megvásárolt szőlőt megmostuk, gyümölcscentrifugával kinyertük a levét, amit gézen keresztül leszűrtünk.

A szőlőleveket beoltottuk az erjedéses romlást előidéző *S. cerevisiae* élesztőgombával és a további vizsgálatokat ezekkel a levekkel végeztük.

#### MIC értékek meghatározása tápoldatban és szőlőlében

A MIC értékek meghatározása tápoldat hígítási módszerrel történt. A tesztelt fahéj és citrom illóolaj koncentrációk 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 és 2 mg/ml értékek voltak. A szőlőlével lefolytatott vizsgálatok során TWEEN 40 helyett vegyes virágmézset használtunk az illóolaj egyenletes eloszlásának javítására. A kapott oldatokat 25 °C és 55 °C-on inkubáltuk.

#### *S. cerevisiae* túlélése 100%-os szőlőlében

A  $10^5$  TKE/ml sejtszámra beállított szuszpenziót illóolajjal, hőkezeléssel, illetve a kettő kombinációjával kezeltük, ahol az illóolajok koncentrációja a hőkezelés hőmérsékletén mért MIC értékre volt beállítva.

- Hőkezelés 100 °C és 55 °C-on illóolaj nélkül

1 ml fertőzött 100%-os szőlőlevet 10, 20 és 30 percig kezeltünk 100 °C és 55°C-on. Kezelést követően a kémcsöveket szobahőmérsékletre hűtöttük. Hatlépcsős tizedelő hígítási sort készítettünk, és a sor utolsó három tagjából 100-100 µl-t malátás táptalajra szélesztettük. 24 óra inkubációt követően meghatároztuk a sejtszámokat.

- Illóolaj adagolása hőkezelés nélkül

4800 µl szőlőlébe 100 µl  $10^5$  TKE/ml szuszpenziót adagoltunk és 100 µl illóolajat adtunk hozzá (MIC koncentrációban). Kezelési idő: 10, 20 és 30 perc. A kezelés után hatlépcsős hígítást készítettünk, és az előző pontokban leírtakhoz hasonlóan határoztuk meg a sejtszámot.

- Illóolaj és hőkezelés együttes hatása

4800 µl szőlőlébe 100 µl  $10^5$  TKE/ml szuszpenziót adagoltunk és 100 µl illóolajat adtunk hozzá, majd 55°C-on kezeltük 10, 20 és 30 percig. Ezután szobahőmérsékletre hűtöttük, az előző pontokban leírtakhoz hasonlóan határoztuk meg a sejtszámot. Ebben az esetben a MIC koncentráció mellett MIC/2 és 2MIC értékkel is dolgoztunk.

#### Illóolajok és hőkezelés hatása natúr szőlőlében

A natúr szőlőlevet nem oltottuk be élesztővel, a természetes romlást követtük. A fent leírt kezelések után az egyik sorozatot hűtve, a másikat szobahőmérsékleten tároltuk. A mintákat naponta ellenőriztük 36 napon keresztül és figyeltük a zavarosodást, buborékok, illetve a cefreillat megjelenését.

#### **4.9 Alkalmazott statisztikai módszerek**

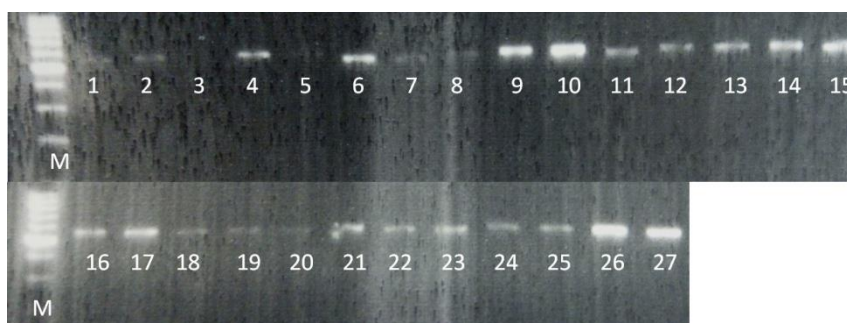
Vizsgálati eredményeinket egyutas és kétutas ANOVA elemzéssel értékeltük ki, R Works 2.8.1, illetve GraphPad Prisma 6.0 szoftverek segítségével ( $P < 0,05$  szignifikancia szint mellett).

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1 Baktériumtörzsek izolálása és meghatározása élelmiszerekről

#### Élelmiszerekről izolált baktériumok meghatározása

A zöldségekről és húsokról 28 db tiszta tenyészetet sikerült izolálni. Az izolátumok PCR-es vizsgálatát a specifikus primer párral elvégezve mindegyik esetben tapasztaltunk termékképződést egy izolátum kivételével (U2, 3. sáv). A 2. ábra a PCR reakció eredményeit mutatja, az izolátumok listáját pedig a 3. táblázat tartalmazza.



**2. ábra.** A környezeti izolátumok tiszta tenyészeinek PCR eredménye. M- marker; 1-F; 2-S; 3-U2; 4-PAPR1; 5-PAPR2; 6-PAPR3; 7-PAPR4; 8-R1; 9-R3; 10-R4; 11-R5; 12-P1; 13-P2; 14-SK1; 15-SK2; 16-SK4; 17-SB2; 18-CS SAL 2; 19-CS SAL 3; 20-CS1; 21-CS2; 22-KA1; 23-KA2; 24-KA4; 24-KA5; 26-KA6; 27-KA8.

3. táblázat. Húsokról és zöldségekről izolált törzsek listája.

| Sorszám | Egyéni kód | Izolálás helye/ideje                        | Gram festés | Név                           | SZMC szám |
|---------|------------|---------------------------------------------|-------------|-------------------------------|-----------|
| 1.      | F          | bőrmentes csirkemell felülete/ Szeged, 2014 | G-negatív   | <i>Pseudomonas sp.</i>        | 23436     |
| 2.      | S          | bőrmentes csirkemell felülete/ Szeged, 2014 | G-negatív   | <i>Pantoea agglomerans</i>    | 23437     |
| 3       | U2         | uborka felülete/Szeged, 2014                | G-pozitív   | -                             | -         |
| 4.      | PAPR1      | étkezési paprika felülete/ Szeged, 2014     | G-pozitív   | <i>Bacillus sp.</i>           | 23439     |
| 5.      | PAPR2      | étkezési paprika felülete/ Szeged, 2014     | G-pozitív   | <i>Bacillus sp.</i>           | 23440     |
| 6.      | PAPR3      | étkezési paprika felülete/ Szeged, 2014     | G-pozitív   | <i>Arthrobacter sp.</i>       | 23441     |
| 7.      | PAPR4      | étkezési paprika felülete/ Szeged, 2014     | G-negatív   | <i>Microbacter sp.</i>        | 23442     |
| 8.      | R1         | hónapos retek felülete/ Szeged, 2014        | G-negatív   | <i>Pseudomonas sp.</i>        | 23443     |
| 9.      | R3         | hónapos retek felülete/ Szeged, 2014        | G-pozitív   | <i>Bacillus sp.</i>           | 23444     |
| 10.     | R4         | hónapos retek felülete/ Szeged, 2014        | G-pozitív   | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 23445     |
| 11.     | R5         | hónapos retek felülete/ Szeged, 2014        | G-negatív   | <i>Microbacter sp.</i>        | 23446     |
| 12.     | P1         | paradicsom felülete/ Szeged, 2014           | G-pozitív   | <i>Bacillus sp.</i>           | 23447     |
| 13.     | P2         | paradicsom felülete/ Szeged, 2014           | G-pozitív   | <i>Bacillus sp.</i>           | 23448     |
| 14.     | SK1        | saláta külső levele/ Szeged, 2014           | G-pozitív   | <i>Bacillus sp</i>            | 23449     |

|     |          |                                      |           |                                  |       |
|-----|----------|--------------------------------------|-----------|----------------------------------|-------|
| 15. | SK2      | saláta külső levele/<br>Szeged, 2014 | G-pozitív | <i>Bacillus megaterium</i>       | 23450 |
| 16. | SK4      | saláta külső levele/<br>Szeged, 2014 | G-pozitív | <i>Bacillus sp</i>               | 23451 |
| 17. | SB2      | saláta belső levele/<br>Szeged, 2014 | G-negatív | <i>Enterobacter sp.</i>          | 23452 |
| 18. | CS SAL2  | csomagolt saláta /<br>Szeged, 2014   | G-negatív | <i>Pseudomonas sp.</i>           | 23453 |
| 19. | CS SAL 3 | csomagolt saláta /<br>Szeged, 2014   | G-negatív | <i>Pseudomonas sp.</i>           | 23454 |
| 20. | CS1      | csírákeverék / Szeged,<br>2014       | G-negatív | <i>Pseudomonas sp.</i>           | 23455 |
| 21. | CS2      | csírákeverék / Szeged,<br>2014       | G-negatív | <i>Pseudomonas sp.</i>           | 23456 |
| 22. | KA1      | friss kacsamell/Szeged,<br>2015      | G-negatív | <i>Pseudomonas sp.</i>           | 23457 |
| 23. | KA2      | friss kacsamell/Szeged,<br>2015      | G-negatív | <i>Pseudomonas sp.</i>           | 23458 |
| 24. | KA3      | friss kacsamell/Szeged,<br>2015      | G-pozitív | <i>Kurthia gibsonii</i>          | 23459 |
| 25. | KA4      | friss kacsamell/Szeged,<br>2015      | G-pozitív | <i>Lactococcus lactis</i>        | 23460 |
| 26. | KA5      | friss kacsamell/Szeged,<br>2015      | G-pozitív | <i>Bacillus methylotrophicus</i> | 23461 |
| 27. | KA6      | friss kacsamell/Szeged,<br>2015      | G-pozitív | <i>Bacillus methylotrophicus</i> | 23462 |
| 28. | KA8      | friss kacsamell/Szeged,<br>2015      | G-negatív | <i>Pantoea sp.</i>               | 23463 |

---



A kapott eredmények alapján a nyers húsokról és friss zöldségekről 7 törzset fajsztin, 20 törzset pedig nemzetség szintjén tudtunk meghatározni. A *Pseudomonas* és *Bacillus* nemzetség tagjainak jelenléte a zöldségeken elég szokványos, nem meglepő. A *P. agglomerans* opportunista patogén baktérium kétszer is megjelent a húsokról izolált törzsek között. A *K. gibsonii* aerob, nem spórázó baktérium, gyakran izolálható hűtött tárolás után 16 °C fölött baromfi- és sertéshúsokról. A húsromlást okozó baktériumok közé tartozik, friss és pácolt húsok esetében (Bergey's Manual 2009). A *L. lactis* jelenléte a friss kacsamelleken nem megszokott, felveti a keresztszennyeződés lehetőségét, mivel a módosított gázösszetételű csomagolásban tárolt feldolgozott hústermékek esetében gyakori lehet (Hamasaki et al. 2003). A törzsek megőrzésre kerültek a Szegedi Tudományegyetem TTIK Mikrobiológiai Tanszék által fenntartott Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteményben (SZMC; WDCM 987) -80 °C hőmérsékleten.

## **5.2 Illóolajok és fő komponenseik antimikrobiális és biofilmképzést gátló hatása**

### **5.2.1 Illóolajok összetétele**

Az illóolajok fő komponenseinek arányát az Aromax Zrt. bocsátotta rendelkezésünkre, a Semmelweis Egyetem Farmakognóziái Intézete pedig azonosította a minor összetevőket is. Az 4. táblázatból látható, hogy a boróka és a citrom fő komponensként főleg egyszerű monoterpén szénhidrogéneket tartalmaz, míg a majoránna terpén-alkoholokat és monoterpén szénhidrogéneket, a muskotályzsálya pedig egy terpén-alkoholt (linalool) és annak acetátos formáját tartalmazza. A fahéj fő összetevője a fahéjaldehyd, amely egy aromás aldehyd, míg a kakukkfű timolja a fenolok közé sorolható. A szakirodalom szerint a legerősebb antimikrobiális hatással a fenolos jellegű összetevők (pl. karvakrol, timol) rendelkeznek (Hyltdgaard et al. 2012).

4. táblázat. A felhasznált illóolajok és fő komponenseik (A gyártó és egyéni tesztelés adatai alapján).

| Illóolaj        | Főbb összetevők      | Komponens százalékos aránya (%) | Komponens százalékos aránya (%) |
|-----------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                 |                      | 2013                            | 2014                            |
| Citrom          | limonén              | 83,2                            | 52,1                            |
|                 | $\beta$ -pinén       | 9,5                             | 16,9                            |
|                 | $\gamma$ -terpinén   | 5,6                             | 10,5                            |
| Boróka          | $\alpha$ -pinén      | 40,7                            | 27,5                            |
|                 | $\beta$ -pinén       | 36                              | 27,2                            |
|                 | p-cimén              | 18,9                            | 21,9                            |
| Majoránna       | terpinén-4-ol        | 33,5                            | 15,4                            |
|                 | $\gamma$ -terpinén   | 19,5                            | 9,2                             |
|                 | $\beta$ -fellandréen | 8                               | -                               |
|                 | p-cimén              | -                               | 21,2                            |
| Muskotályzsálya | linalil acetát       | 84                              | 44,5                            |
|                 | linalool*            | 13,6                            | 30,7                            |
| Fahéj           | fahéjaldehyd         | 93,1                            | 76,4                            |
|                 | cinnamil-acetát      | 2,5                             | -                               |
| Kakukkfű        | timol                | 51,8                            | 23,2                            |
|                 | p-cimén              | 31,7                            | 30,1                            |
|                 | $\gamma$ -terpinén   | 6,2                             | 10,0                            |

\*a második legnagyobb arányban előforduló komponens

A majoránna és kakukkfű esetében jelentős összetételbeli különbséget tapasztaltunk a 2013-ban, illetve a 2014-ben készített olajokat összehasonlítva. A majoránna fő összetevője a 2013-ban a terpinén-4-ol volt (33,5%), 2014-ben pedig a p-cimén (21,2%). A kakukkfű esetében 2013-ban a fő komponens a timol volt (51%), míg 2014-ben ennek előanyaga a p-cimén (30,1%) (4. táblázat).

#### 5.2.2 MIC értékek meghatározása

A 5. táblázatban rögzítettek alapján a G-pozitív baktériumok esetében a fahéj, kakukkfű és ezek fő komponensei mutattak 1 mg/ml és ez alatti értékeket. A G-negatív baktériumoknál hasonló képet kaptunk, kivételt képez a *P. putida*, amely ellenállóbbnak bizonyult kakukkfűvel szemben, mint a többi baktérium. Élesztők esetében a kakukkfű és  $\alpha$ -pinén

kivételével (1,5-2 mg/ml), majdnem az összes illóolaj 1 mg/ml alatti koncentrációban már gátolta a mikrobák szaporodását.

A fő komponenseket vizsgálva látható, hogy az aromás gyűrűt tartalmazó fahéj-aldehid és timol minden esetben hatékonyabban bizonyult a monoterpénekénél, illetve terpén alkoholoknál. A TWEEN 40 önmagában, az alkalmazott koncentrációban nem fejtett ki gátló hatást a tesztelt mikrobákkal szemben. Amennyiben az illóolajra nem sikerült megállapítani a MIC értéket, a fő komponens már nem került vizsgálatra.

5. táblázat. Illóolajok és komponenseik minimális gátló koncentrációi (MIC, mg/ml).

| Illóolajok és<br>komponensek | <i>B. cereus var.<br/>mycoides</i> | <i>B.<br/>subtilis</i> | <i>P.<br/>putida</i> | <i>E.<br/>coli</i> | <i>P. fluorescens</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. anomala</i> | <i>D.<br/>hansenii</i> |
|------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|-------------------|------------------------|
| Muskotályzsálya              | 0,5                                | 0,5                    | >100                 | 2                  | 5,5                   | 80                      | 25               | 1                 | 2                      |
| Boróka                       | 1                                  | 0,5                    | >100                 | 2                  | 15                    | 34                      | 3,2              | 0,5               | 4                      |
| Citrom                       | 1                                  | 1                      | 25                   | 4                  | >30                   | >100                    | >100             | 0,75              | 1                      |
| Marjoránna                   | 0,25                               | 0,5                    | 2                    | 0,5                | 4                     | 4                       | 3,2              | 0,5               | 0,06                   |
| Fahéj                        | 0,25                               | 0,12                   | 0,25                 | 0,25               | 0,25                  | 1                       | 0,4              | 0,1               | 0,1                    |
| Kakukkfű                     | 0,5                                | 0,5                    | 20                   | 1                  | 1,5                   | 2                       | 0,8              | 1,5               | 2                      |
| $\alpha$ -pinén              | 6                                  | 2                      | -                    | 1                  | 12,5                  | 50                      | 1,6              | 1                 | 2                      |
| Limonén                      | 4                                  | 2                      | -                    | 6                  | -                     | -                       | -                | 1                 | 1                      |
| Linalool                     | 6                                  | 2                      | -                    | 3                  | 3,5                   | 5                       | -                | 1                 | 1                      |
| Terpinén-4-ol                | 6                                  | 1                      | 4                    | 2                  | 1,12                  | 4                       | 3,2              | 1                 | 1                      |
| Fahéjaldehid                 | 0,25                               | 0,25                   | 0,25                 | 0,25               | 0,25                  | 0,25                    | 0,4              | 0,06              | 0,06                   |
| Timol                        | 0,12                               | 0,5                    | 0,5                  | 0,5                | 0,25                  | 0,5                     | 0,8              | 0,5               | 0,5                    |

- nem került tesztelésre

Az izolátumokból a csirke-, illetve kacsamellről izolált *P. agglomerans* opportunistá patogént, illetve a *K. gibsonii*-t választottuk ki további vizsgálatokra. Ezek az izolátumok a laboratóriumi törzsekhez hasonló érzékenységet mutattak (6. táblázat): a legalacsonyabb MIC értékeket a fahéj és fahéjaldehid eredményezték mindkét törzs esetében. A citrom és boróka illóolajok értékei magasabbak voltak, mint 25 és 100 mg/ml ezért további kísérleteket nem végeztünk velük és komponenseikkel.

6. táblázat. A tesztelt izolátumok MIC értékei (mg/ml).

| Illóolajok és komponensek | <i>Pantoea agglomerans</i> | <i>Kurthia gibsonii</i> |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Muskotályzsálya           | 16                         | 8                       |
| Boróka                    | >25                        | >25                     |
| Citrom                    | >100                       | >100                    |
| Majoránna                 | 4                          | 4                       |
| Fahéj                     | 0,2                        | 0,2                     |
| Kakukkfű                  | 4                          | 2                       |
| $\alpha$ -pinén           | -                          | -                       |
| Limonén                   | -                          | -                       |
| Linalool                  | 2                          | 2                       |
| Terpinén-4-ol             | 2                          | 2                       |
| Fahéjaldehid              | 0,5                        | 0,2                     |
| Timol                     | 0,5                        | 1                       |

A megváltozott összetételű majoránna és kakukkfű illóolaj MIC értékeit a 7. táblázat tartalmazza. A legtöbb törzsnél a megváltozott összetétel magasabb MIC értékekhez vezetett. A kakukkfűvel azonban, *P. putida* esetében a korábbinál jelentősen alacsonyabb értéket kaptunk (20 mg/ml helyett 8 mg/ml). Az élelmiszerről származó izolátumok esetében a MIC értékek meghatározása már az új összetételű olajokkal történt.

Dorman és Deans (2000) is beszámol a p-cimén, a timolhoz képest kevésbé erős antimikrobiális hatásáról. A *P. putida* esetében, ahol a kakukkfű MIC értéke jelentősen lecsökkent a 2014-es változatnál, fontos kiemelni, hogy valószínűleg a fő összetevő mellett a minor komponenseknek is fontos szerepe volt az antimikrobiális hatás kialakításában. A kakukkfű esetében a p-cimén a timol előanyaga (Poulose és Croteau, 1978), tehát feltételezhető, hogy a bioszintetikus út ezen lépése gátlódott ebben az esetben. A 2014-es év egy rendkívül csapadékos év volt, amely nagymértékben befolyásolhatta a növényi

metabolitok termelődését. Radácsi és munkatársai (2014) kimutatták, hogy a vízellátottság mértéke jelentősen befolyásolta a kerti bazsalikom és borsfű illóolaj összetételét. A rosszabb vízellátottság hatására a bazsalikomban levő linalool részaránya 5-10%-kal csökkent, míg az 1,8-cineol és a tau-kadinol részaránya emelkedett.

7. táblázat. Megváltozott összetételű illóolajok MIC értékei (mg/ml).

| Törzsek                        | Kakukkfű |       | Majoránna |      |
|--------------------------------|----------|-------|-----------|------|
|                                | MIC      |       | MIC       |      |
|                                | 2013     | 2014  | 2013      | 2014 |
| <i>E. coli</i>                 | 1        | 32 ↑  | 0,5       | 32 ↑ |
| <i>P. putida</i>               | 20       | 8↓    | 2         | 8↑   |
| <i>P. fluorescens</i>          | 1,5      | 2↑    | 4         | 8↑   |
| <i>B. cereus var. mycoides</i> | 0,5      | 0,8 ↑ | 0,25      | 16 ↑ |
| <i>B. subtilis</i>             | 0,5      | 0,8↑  | 0,5       | 16↑  |
| <i>L. monocytogenes</i>        | 2        | 4 ↑   | 4         | 4    |
| <i>P. anomala</i>              | 1,5      | 2↑    | 0,5       | 8↑   |

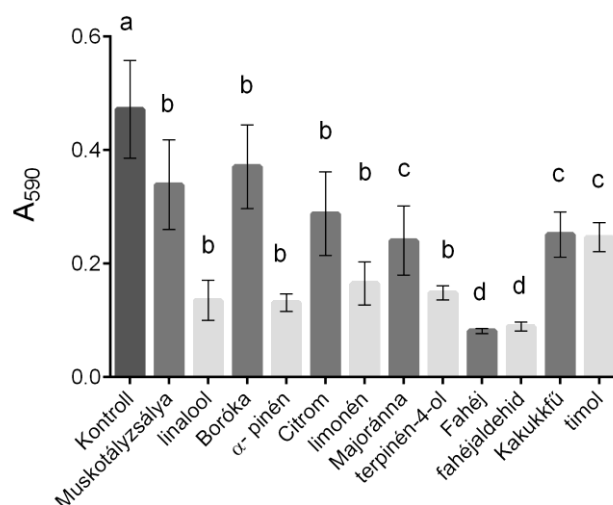
A nyilak a változás irányát mutatják (↑ növekedés; ↓ csökkenés).

Összességében, a citrom és boróka illóolajok kevésbé voltak hatékonyak a tesztelt mikrobaikkal szemben, mint a többi olaj. Prabuseenivasan és munkatársai (2006) agardiffúziós módszerrel tesztelték a citrom illóolajat, és hatékonyak találták *S. aureus*, *E. coli* és *B. cereus* baktériumok ellen. A fahéj illóolajat tesztelve, alacsony MIC értékeket kaptak (0,8-3,2 mg/ml); kísérleteinkben mi még ennél is jobb hatást mértünk ki: 0,1-0,4 mg/ml között változtak ezek az értékek. Az eltérések adódhatnak az illóolajok összetételében levő különbségekből; a mi esetünkben a fő összetevő magasabb százalékban volt jelen az olajban. Egy másik kísérletben (Pepelnjak és mtsai 2005) boróka illóolajjal hasonlóan magas MIC értékeket kaptak baktériumokra; az *E. coli* szaporodását például nem gátolta az olaj, ellentétben a mi kísérleteinkkel, ahol a baktérium MIC értéke 2 mg/ml volt. A kapott eltérések adódhatnak az egyes illóolaj kemotípusok összetételében levő, illetve az egyes mikroba izolátumok érzékenységében meglévő különbségekből.

### 5.2.3 Illóolajok és komponenseik biofilmképződést gátló hatása

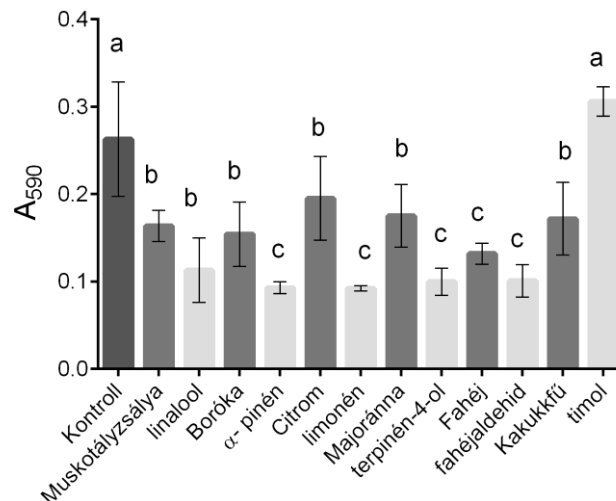
#### Egyfajos biofilmek kezelése - G-pozitív baktériumok

A *B. cereus* ellen a fahéj és a majoránna illóolaj hatása volt kiemelkedő; szignifikáns eltérést észleltünk a kontrollhoz és a többi mintához képest. A többi olaj hatása is eltért a kezeletlen mintától. A komponensek mindegyike (a timolt és a fahéjaldehydet kivéve), hatékonyabb biofilmképzés gátlónak bizonyult, mint az olajok ( $P < 0,05$ ) (3. ábra).



**3. ábra.** A *B. cereus* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

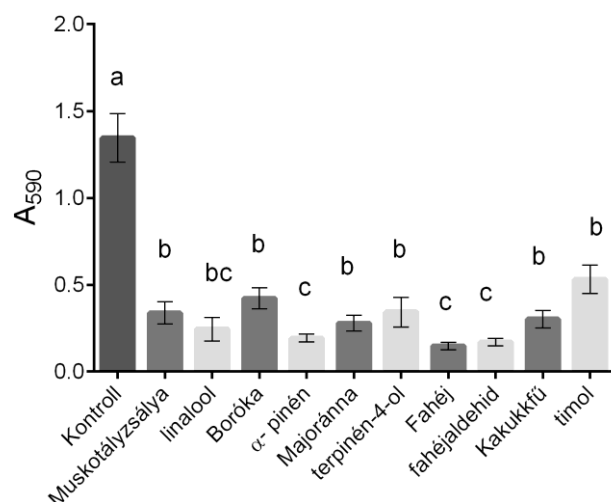
A *B. subtilis* biofilm képzését is a fahéjolaj gátolta a leghatékonyabban. A komponensek nagy része ebben az esetben is hatásosabb volt, kivéve a timolt (4. ábra).



**4. ábra.** A *B. subtilis* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

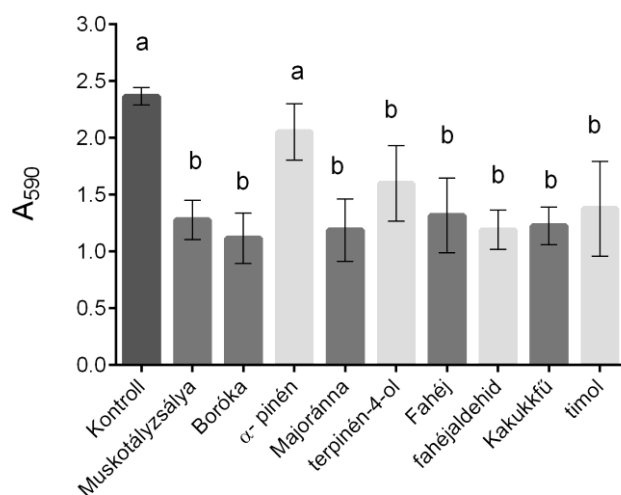
A *L. monocytogenes* citrom illóolajjal szemben nem mutatott érzékenységet. A MIC érték 100 mg/ml felett volt, így ezzel az olajjal további kísérleteket nem végeztünk. Élelmiszer tartósítás szempontjából ez a magas koncentráció már kellemetlen íz- és illatváltozást okozna. Az 5. ábrán látható, hogy a tesztelt olajok mindegyike hatékony biofilmképzés gátlónak bizonyult; a legjobb ebben az esetben is a fahéj illóolaj volt. A komponensek esetében csak az  $\alpha$ -pinén és linalool voltak szignifikánsan hatékonyabbak az olajoknál. Fontos megemlíteni, hogy az  $\alpha$ -pinén MIC értéke 40 mg/ml volt; ez már az élelmiszeripari alkalmazást megnehezíti az intenzív aroma miatt. Sandasi és munkatársai (2008) által végzett vizsgálatokban a linalool és  $\alpha$ -pinén 1mg/ml koncentrációban serkentették a 6 napos *Listeria* biofilmek képződését.





**5. ábra.** A *L. monocytogenes* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

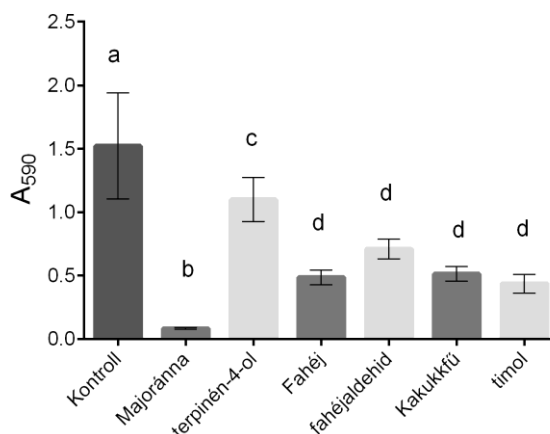
A *S. aureus* biofilmképzését mindegyik illóolaj szignifikánsan gátolta, hatásukat összehasonlítva nem tértek el egymástól. A komponensek közül csak a fahéjaldehid volt hatékonyabb az olajánál és a többi komponensnél, az  $\alpha$ -pinén pedig hatástalan volt az *S. aureus* biofilmekkel szemben (6. ábra). Jia és munkatársai (2011) hasonlóan jó eredményeket kaptak fahéjaldehid esetében, ahol 0,6 mg/ml koncentrációban gátolt a komponens, esetünkben ez a koncentráció 0,2 mg/ml volt (MIC/2).



**6. ábra.** A *S. aureus* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

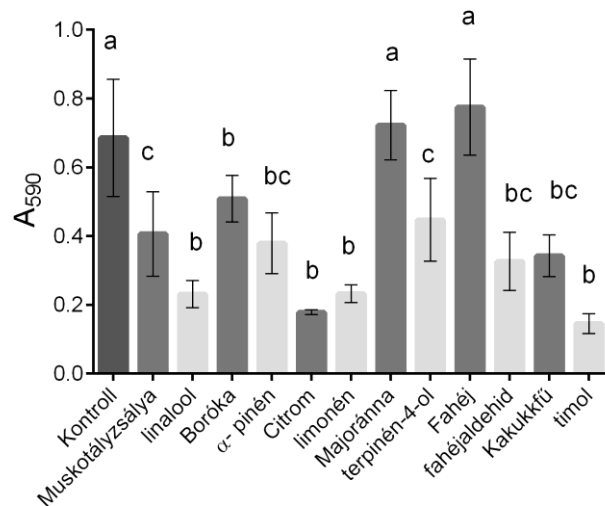
### Egyfajos biofilmek kezelése - G-negatív baktériumok

A *P. putida* esetében csak a majoránna, fahéj és kakukkfű illóolajok illetve fő komponenseik biofilmképzés gátló hatását vizsgáltuk. A többi illóolaj MIC értéke túl magasnak bizonyult. A legjobb gátló a majoránna volt, azonban fő komponensének hatása nem tért el szignifikánsan a kontroll mintáktól. Jelen esetben a fahéjaldehid hatása csak a kontrolltól tért el, a timol bizonyult a leghatásosabb komponensnek. (7. ábra).



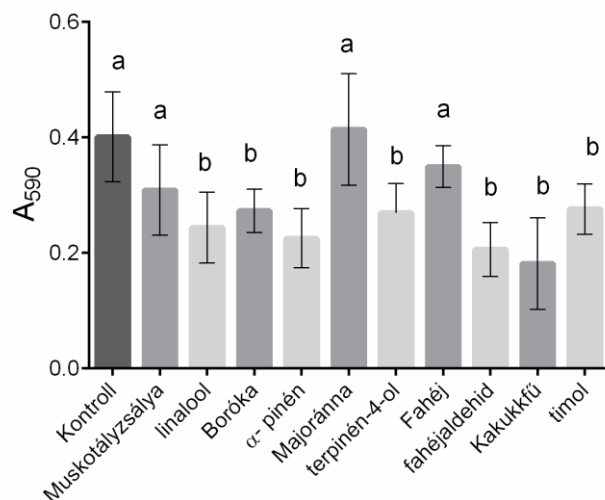
**7. ábra.** A *P. putida* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

A majoránna és fahéj kivételével az olajok és komponensek gátolták az *E. coli* biofilmképzését. A többi komponens gátló hatása szignifikánsan jobb volt, mint az olajoké (8 ábra). A fahéj illóolaj nem bizonyult hatásos gátlószernek, ezzel ellentétben viszont a fahéjaldehid jó anti-biofilm hatását Amalaradjou és munkatársai (2010) is kimutatták uropatogén *E. coli* esetében. A linalool hatékonyan gátolta az *E. coli* biofilmek biomasszaképződését Budzyńska és munkatársai (2011) szerint, ezt a mi kísérleteink is alátámasztják.



**8. ábra.** Az *E. coli* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

A *P. fluorescens* esetében is hasonlókat tapasztaltunk, mindegyik olaj és komponens gátló hatást fejtett ki a biofilmképzésére. A komponensek közül a terpinén-4-ol, fahéjaldehid és linalool hatékonyabbak voltak, mint olajaik, a timol és α-pinén nem tértek el a kontrolltól (9. ábra).



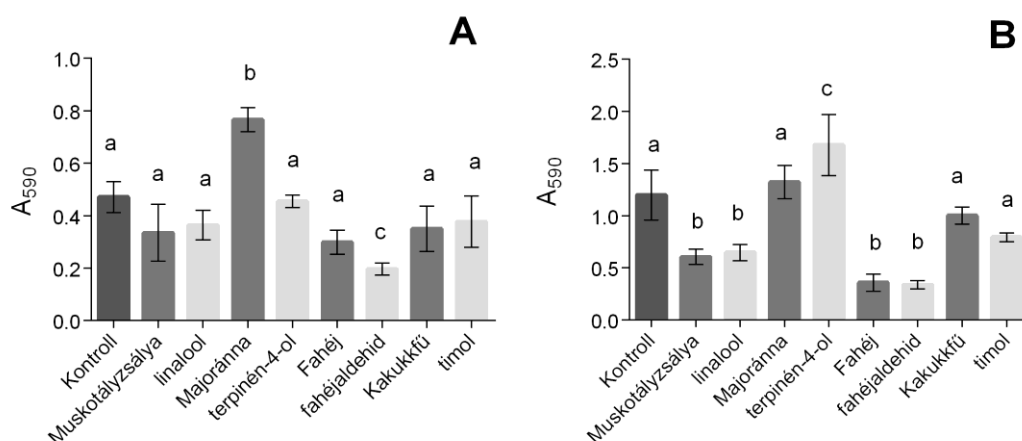
**9. ábra.** A *P. fluorescens* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

#### Egyfajos biofilmek kezelése - élelmiszerről izolált baktériumok

Annak ellenére, hogy a *K. gibbsonii* érzékenynek bizonyult az olajokkal és komponensekkel szemben, a biofilmképzését csak a fahéjaldehid gátolta szignifikánsan. A

majoránna hatása figyelemre méltó, ugyanis itt magasabb értékeket mértünk, mint a kontroll mintáknál; tehát feltételezhető, hogy az olaj serkentette a biofilmképzést.

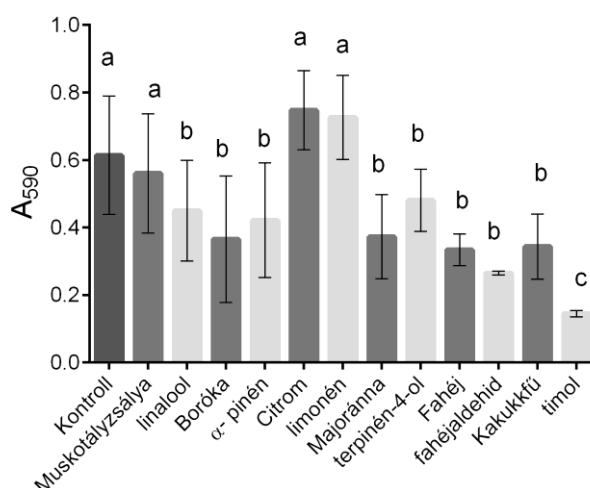
A *P. agglomerans* biofilmképzését ezzel ellentétben a muskotályzsálya, a linalool, valamint a fahéj és fő komponense szignifikánsan gátolták. Nem tapasztaltunk eltérést az olajok és fő komponensek hatása között, kivéve a majoránna esetében, ahol az olaj nem gátolt és a terpinén-4-ol látszólag serkentette a biofilm képzést (10. ábra).



**10. ábra.** Illóolajok és komponenseik (koncentráció: MIC/2) hatása húsokról izolált törzsek biofilmképzésére. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek. **A:** *Kurthia gibsonii* (G-pozitív), **B:** *Pantoea agglomerans* (G-negatív).

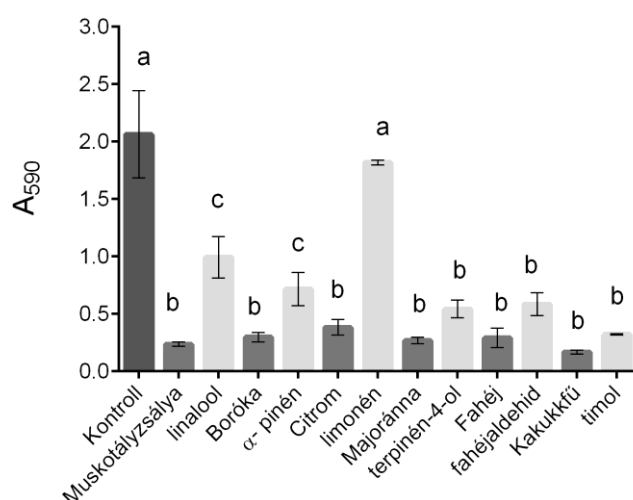
#### Egyfajos biofilmek kezelése - élesztőgombák

A *P. anomala* élesztő esetében kiemelkedő gátló hatással bírt a fahéj és a kakukkfű illóolaj. A citrom, boróka és muskotályzsálya olajoknál nem mértünk eltérést a kontroll mintáktól. A komponensek esetében a limonén nem gátolt, a fahéjaldehid, timol és  $\alpha$ -pinén viszont hatékonyan gátoltak: a timol jobban, mint a kakukkfű olaj (11. ábra).



**11. ábra.** A *P. anomala* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

A *D. hansenii* biofilmképzését a kakukkfű illóolaj gátolta leghatékonyabban, a linalool és limonén kivételével a komponensek hatása jobb volt az olajokénál (12. ábra).



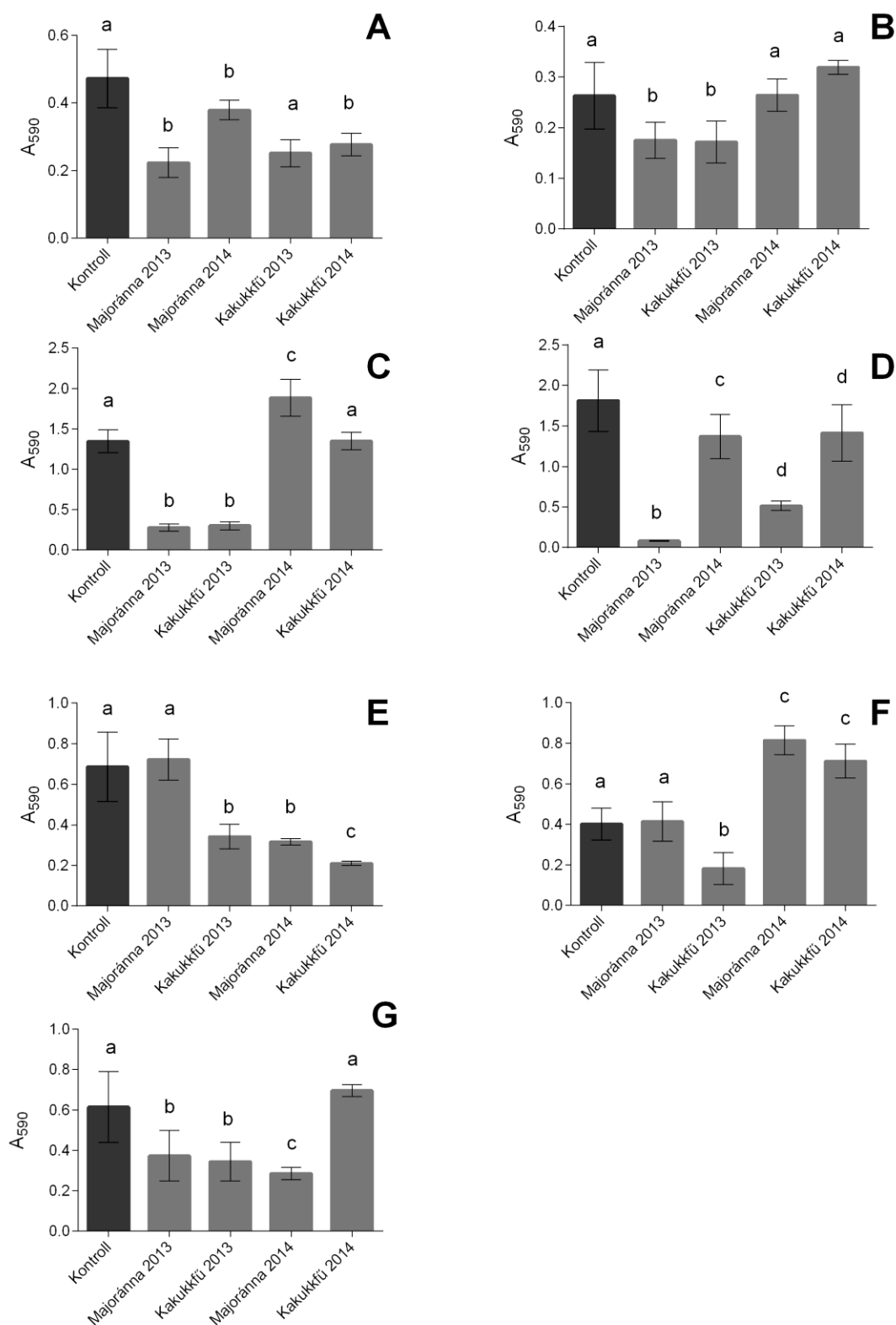
**12. ábra.** A *D. hansenii* biofilmképzése illóolajokkal és komponenseikkel történő kezelést követően. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

Élesztők esetében szegényes az irodalom, ami biofilmképzésüket illeti. A *Candida* fajok kivételt képeznek, számos tanulmány igazolja az illóolajok gátló hatását úgy szabadon úszó sejtek, mint biofilmek esetében. A linalool és geraniol szignifikánsan gátolta a *C. tropicalis*, a borsikafű (amelynek fő összetevője a timol), pedig a *C. albicans* humán patogén biofilmképzését (Souza et al. 2016, Sharifzadeh et al. 2016).

Következtetésképpen, a laboratóriumi törzsek esetében a G-negatív baktériumoknál nem tudjuk egyértelműen kijelenteni, hogy melyik illóolaj vagy illóolaj komponens volt a leghatásosabb biofilmképzést gátló. A mikrobák egyéni érzékenysége befolyásolta a kapott eredményeket. A G-pozitív baktériumok esetében a leghatásosabb olaj és komponens a fahéj és fahéjaldehid voltak, kevésbé hatásosnak pedig a citrom és a boróka bizonyultak. Az izolátumok esetében szintén a fahéj és komponense voltak a leghatásosabbak, kevésbé gátolt a majoránna és a terpinén-4-ol. Élesztőgombáknál a limonén volt a legkevésbé hatékony fő összetevő, a többi olaj esetében egyik hatása sem volt kiemelkedően jó vagy rossz.

#### Megváltozott összetételű illóolajok hatása mikrobák biofilmképzésére

A majoránna és kakukkfű illóolajoknál a MIC és biofilmképzést gátló hatás is megváltozott. Az 13. ábrán láthatjuk, hogy annak ellenére, hogy a MIC értékek magasabbak voltak a 2014-es olajoknál, a biofilmképzés gátlás mértékét ez nem csökkentette. *L. monocytogenes*-nél a majoránna és *P. fluorescens*-nél mindkét illóolaj esetében a kontroll mintáknál magasabb értékeket kaptunk. Feltételezhető, hogy az illóolajok serkentő hatással voltak a biofilmképzésre. Hasonló eredményeket kaptak Sandasi és munkatársai (2008), ahol számos monoterpén serkentette a *L. monocytogenes* biofilmképzését. Ezen eredményeket Leonard és munkatársai (2010) is megerősítették két évvel később fenolos (eugenol, karvon) összetevőjű olajok esetében; azonban fontos kiemelni, hogy egyik vizsgálatban sem határozták meg az anyagok MIC értékét, mindkét esetben azonos, 1 mg/ml koncentrációkat használtak. Hasonló koncentrációnál, amikor a fenol típusú timol volt a fő összetevő (2013-as kakukkfű illóolaj MIC/2 értéke), a mi eredményeinkben a *Listeria* biofilmképzése gátolódott. Serkentést a megváltozott összetételű kakukkfű illóolaj 2 mg/ml (MIC/2) koncentrációnál tapasztaltunk. Úgy tűnik, hogy a prekursor p-cimén felhalmozódása és a timol csökkenése a gátlás helyett olyan stressz választ indukált, ami erősítette a biofilmképzést, így adva lehetőséget a baktérium túlélésére.



**13. ábra.** Megváltozott összetételű majoránna és kakukkfű illóolajok hatása a vizsgált mikrobák biofilmképzésére. **A:** *B. cereus*; **B:** *B. subtilis*; **C:** *L. monocytogenes*; **D:** *P. putida*; **E:** *E. coli*; **F:** *P. fluorescens*; **G:** *P. anomala*. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

### Kevert biofilmek – *L. monocytogenes* + *E. coli*

A tesztelt olajok MIC értékeit az 8. táblázat, a kezelések utáni sejtszámokat pedig az 9. számú táblázat tartalmazza.

8. táblázat. Illóolajok és fő komponenseik MIC értékei *L. monocytogenes* és *E. coli* esetében (mg/ml).

| Illóolaj és komponensek | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i> |
|-------------------------|-------------------------|----------------|
| Fahéj                   | 1                       | 0,25           |
| Majoránna               | 4                       | 0,5            |
| Muskotályzsálya         | 80                      | 2              |
| Kakukkfű                | 2                       | 0,8            |
| Fahéjaldehid            | 0,25                    | 0,25           |
| Terpinén-4-ol           | 4                       | 2              |
| Linalool                | 5                       | 3              |
| Timol                   | 0,5                     | 0,8            |

24 órás kezelést követően a kontroll mintákban a *Listeria* sejtszám  $10^{11}$  TKE/ml, az *E. coli* sejtszám  $10^5$  TKE/ml volt, a *Listeria* túlnta az *E. coli*-t. Az irodalomban említésre kerül, hogy a *Listeria* kevert közösségekben erősebb biofilmeket képez, mint egyfajos tenyészetek esetében, sőt bizonyos fajok jelenléte serkentheti növekedését (Giaouris et al. 2014).

0,1 mg/ml koncentrációjú fahéj illóolajjal való kezelést követően a biofilmképzés mértéke szignifikánsan csökkent és a sejtszám mindkét baktériumnál  $10^{10}$  TKE/ml volt. Ez 5 log sejtszám növekedést jelent *E. coli* és 1 log csökkenést a *Listeria* esetében. Észrevehető, hogy a fahéj olaj jelenlétében a *Listeria* sejtszám csökkenése a közösség másik tagjának sejtszámbeli növekedését eredményezte. A 0,5 mg/ml koncentrációnál, amely ez *Listeria* MIC/2 értéke, egyfajos biofilmet eredményezett, csak az *E. coli* volt kimutatható, így a mért biofilmképzés gátlás erre a törzsre vonatkozik. Magasabb koncentrációkban a fahéj olaj teljes biofilmgátlást eredményezett (14. ábra).

A fahéjaldehid hatása nagyjából megegyezett a fahéj olajával, azonban gátló hatása már 0,06 mg/ml (MIC/4 mindkét baktériumnál) koncentrációnál kezdődött.

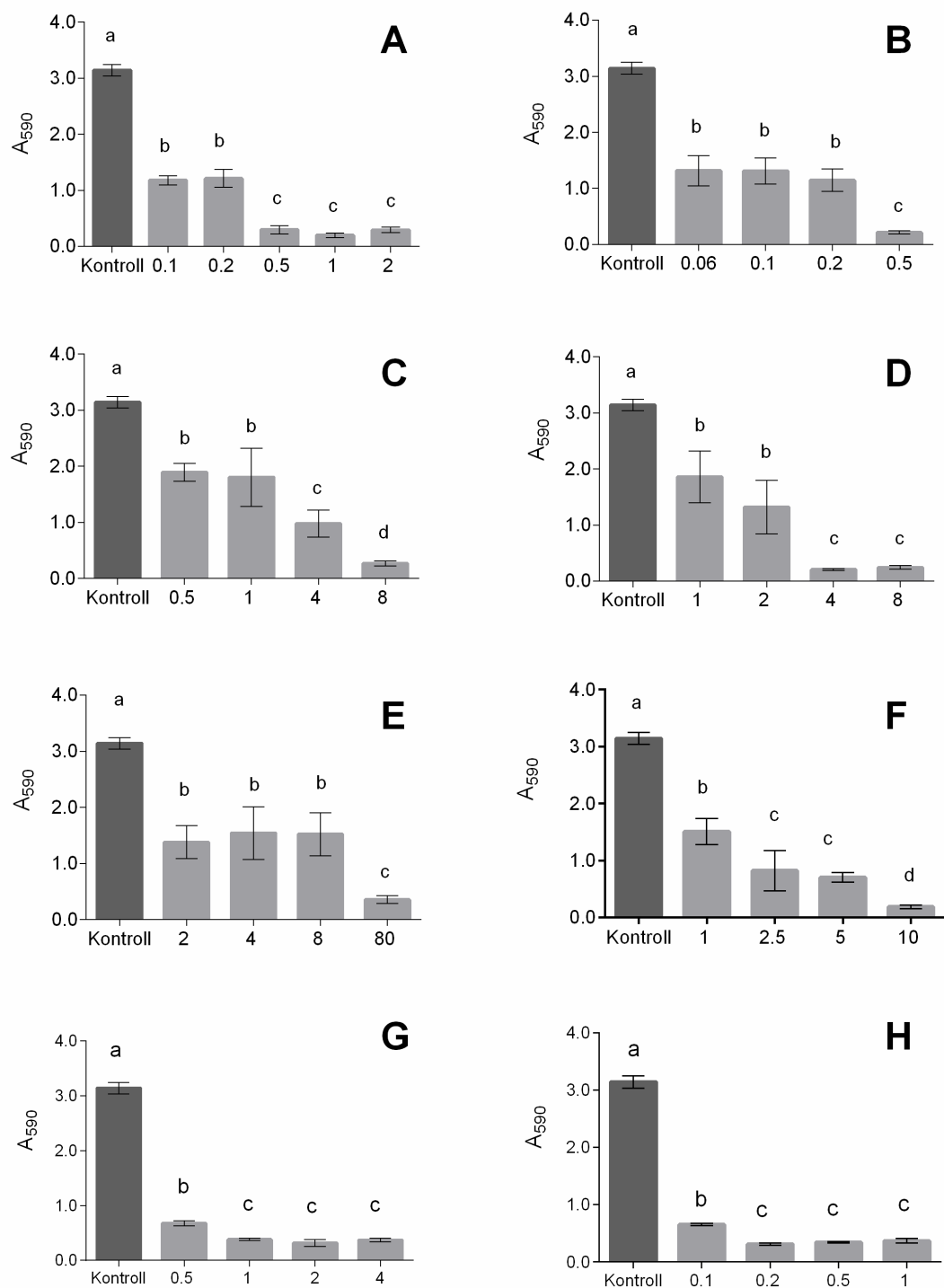
A kakukkfű illóolaj hatása koncentrációfüggő volt; gátló hatása 0,5 mg/ml-nél kezdődött.

A timol gátlása a kakukkfűolaj MIC/4 koncentrációjának megfelelő értéknél kezdődött



mindkét baktérium esetében (0,1 mg/ml); MIC/2 értékeknél már nem tudtunk kimutatni élő sejteket a tenyészetekből.

A majoránna és fő komponense hatására az *E. coli* nem volt jelen a kevert tenyészetekben egyik koncentráció esetében sem, a rögzített biofilmképzés gátlás a *Listeria* sejtjeire vonatkozott. A muskotályzsálya esetében csak a legmagasabb koncentrációnál tudtunk kimutatni gátlást (80 mg/ml), ez egyben a MIC érték is volt *Listeria* esetében. Érdekes módon  $10^7$  TKE/ml *Listeria* sejtszámot tudtunk kimutatni ennél a koncentrációnál. Linalool esetében MIC alatti koncentrációknál indult be a biofilmképzés gátlása (2,5 mg/ml) (14. ábra, 9. táblázat).



**14. ábra.** Illóolajok és komponenseik hatása az *L. monocytogenes*+ *E. coli* kevert biofilmek képződésére. Az X tengelyen az illóolajok koncentrációja látható mg/ml-ben. **A:** fahéj illóolaj; **B:** fahéjaldehid; **C:** majoránna illóolaj; **D:** terpinén-4-ol; **E:** muskotályzsálya illóolaj; **F:** linalool; **G:** kakukkfű; **H:** timol. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

9. táblázat. A *L. monocytogenes* és *E. coli* kevert tenyészetek sejtszámai illóolajos kezelést követően.

| <i>Listeria monocytogenes</i> log <sub>10</sub> TKE/ml |          |               |              |              |              |           |           |              |           |           |           |             |         |
|--------------------------------------------------------|----------|---------------|--------------|--------------|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|-------------|---------|
|                                                        | Kontroll | 0,06<br>mg/ml | 0,1<br>mg/ml | 0,2<br>mg/ml | 0,5<br>mg/ml | 1 mg/ml   | 2 mg/ml   | 2,5<br>mg/ml | 4 mg/ml   | 5 mg/ml   | 8 mg/ml   | 10<br>mg/ml | 80mg/ml |
| Fahéj                                                  |          |               | 10,47±0,2    | 10,6±0,1     | n.k.         | n.k.      | n.k.      |              |           |           |           |             |         |
| Majoránna                                              |          |               | 7,04±0,32    | 7,11±0,02    | 7,07±0,23    | 7,11±0,34 |           |              |           |           |           |             |         |
| Kakukkfű                                               |          |               |              |              | 9,2±0,1      | n.k.      | n.k.      |              | n.k.      |           |           |             |         |
| Muskotályzsálya                                        | 10±0,00  |               |              |              |              |           | 10,4±0,32 |              | 10,4±0,31 |           | 10,5±0,12 |             | 7,3±0,1 |
| Fahéjaldehid                                           |          | 9,47±0,2      | 9±0,4        | 8±0,3        | n.k.         |           |           |              |           |           |           |             |         |
| Timol                                                  |          |               | 9±0,1        | n.k.         | n.k.         | n.k.      |           |              |           |           |           |             |         |
| Terpinén-4-ol                                          |          |               |              |              |              | 7,07±0,21 | 7,04±0,21 |              | 7±0,32    |           | n.k.      |             |         |
| Linalool                                               |          |               |              |              |              | 9±0,4     |           | 9±0,1        |           | n.k.      |           | n.k.        |         |
| <i>Escherichia coli</i> log <sub>10</sub> TKE/ml       |          |               |              |              |              |           |           |              |           |           |           |             |         |
| Fahéj                                                  |          |               | 10±0,4       | 9,3±0,3      | 4,3±0,45     | n.k.      | n.k.      |              |           |           |           |             |         |
| Kakukkfű                                               |          |               |              |              | 9±0,3        | n.k.      | n.k.      |              | n.k.      |           |           |             |         |
| Majoránna                                              |          |               | n.k.         | n.k.         | n.k.         | n.k.      |           |              |           |           |           |             |         |
| Muskotályzsálya                                        | 5,27±0,1 |               |              |              |              |           | 8,69±0,21 |              | 7,69±0,12 |           | 7,3±0,21  |             |         |
| Fahéjaldehid                                           |          | 8,3±0,2       | 7,47±0,1     | 7,69±0,23    | n.k.         |           |           |              |           |           |           |             |         |
| Timol                                                  |          |               | 9±0,3        | n.k.         | n.k.         | n.k.      |           |              |           |           |           |             |         |
| Terpinén-4-ol                                          |          |               |              |              |              | n.k.      | n.k.      |              | n.k.      |           | n.k.      |             |         |
| Linalool                                               |          |               |              |              |              | n.k.      |           | 8,47±0,2     |           | 8,32±0,11 |           | n.k.        |         |
| n.k.-nem kimutatható                                   |          |               |              |              |              |           |           |              |           |           |           |             |         |

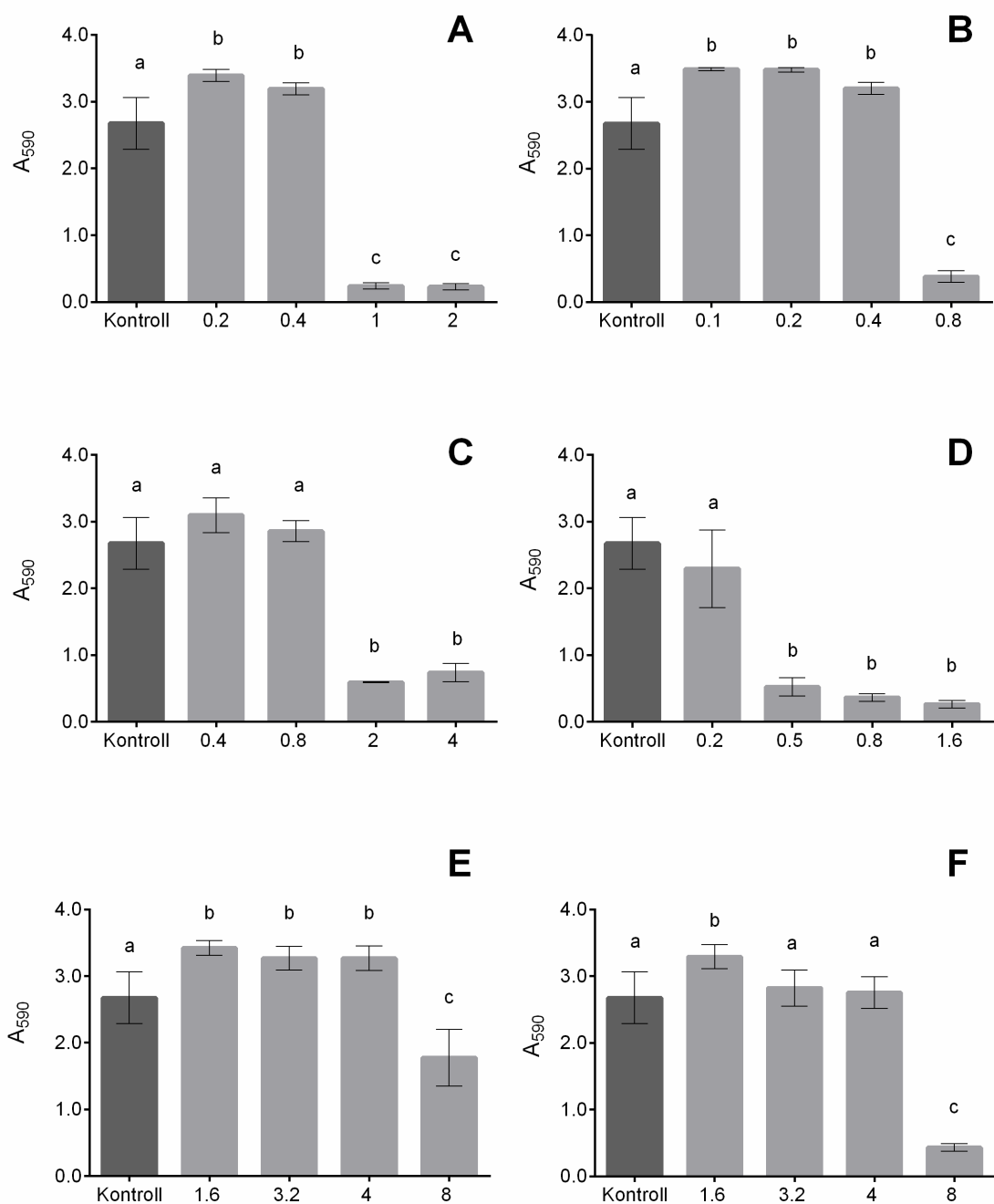
### Kvert biofilmek – *L. monocytogenes* + *S. aureus*

A tesztelt olajok MIC értékeit az 10. táblázat a kezelések utáni sejtszámokat pedig a 11. számú táblázat tartalmazza.

10. táblázat. Illóolajok és fő komponenseik MIC értékeit *L. monocytogenes* és *S. aureus* esetében (mg/ml).

| Illóolaj és komponensek | <i>L. monocytogenes</i> | <i>S. aureus</i> |
|-------------------------|-------------------------|------------------|
| Fahéj                   | 1                       | 0,25             |
| Majoránna               | 4                       | 0,5              |
| Muskotályzsálya         | 80                      | 2                |
| Kakukkfű                | 2                       | 0,8              |
| Fahéjaldehyd            | 0,25                    | 0,25             |
| Terpinén-4-ol           | 4                       | 2                |
| Linalool                | 5                       | 3                |
| Timol                   | 0,5                     | 0,8              |

A kezeletlen mintákban mindkét baktérium  $5 \times 10^7$  TKE/ml sejtszámmal volt jelen. A fahéj alacsony koncentrációknál (0,2 és 0,4 mg/ml) nem gátolta a biofilmképzést és egyik baktérium sejtszáma sem csökkent a közösségben. Hasonló képet mutatott a fahéjaldehyd is, ahol csak a 0,8 mg/ml koncentráció (8 x MIC mindkét baktériumnál) okozott teljes sejtszám csökkenést a közösség tagjainál, így biofilmképzés gátlást is. A kakukkfű illóolaj 2 mg/ml (MIC érték *Listeria* esetében) koncentrációnál volt hatékony, miközben a timol már 0,5 mg/ml-nél (MIC érték *Listeria* esetében) is; túlélő baktériumok nem voltak kimutathatók egyik esetben sem. A majoránna 8 mg/ml koncentrációnál (a *Listeria* esetében 2 x MIC és a *Staphylococcus*-nál 4 x MIC) nem tudtunk kimutatni a *Listeriá*-t a közösségből. Az *S. aureus*  $1 \times 10^5$  TKE/ml volt jelen. A terpinén-4-ol ennél a koncentrációnál mindkét baktériumot elpusztította (15. ábra, 11. táblázat).



**15. ábra.** Illóolajok és komponenseik hatása a *L. monocytogenes*+*S. aureus* kevert biofilmek képződésére. Az X tengelyen az illóolajok koncentrációja látható mg/ml-ben. **A:** fahéj illóolaj; **B:** fahéjaldehid; **C:** kakukkfű illóolaj; **D:** timol; **E:** majoránna illóolaj; **F:** terpinén-4-ol. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

11. táblázat. A *L. monocytogenes* és *S. aureus* kevert tenyészetek sejtszámai illóolajos kezelést követően.

| <i>L. monocytogenes</i> log <sub>10</sub> TKE/ml |          |           |              |              |              |              |            |              |            |              |           |           |
|--------------------------------------------------|----------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|-----------|-----------|
|                                                  | Kontroll | 0,1mg/ml  | 0,2<br>mg/ml | 0,4<br>mg/ml | 0,5<br>mg/ml | 0,8<br>mg/ml | 1<br>mg/ml | 1,6<br>mg/ml | 2<br>mg/ml | 3,2<br>mg/ml | 4 mg/ml   | 8 mg/ml   |
| Fahéj                                            |          |           | 7±0,1        | 7,32±0,15    |              | n.k.         | n.k.       |              | n.k.       |              |           |           |
| Majoránna                                        |          |           |              |              |              |              |            | 6,32±0,12    |            | 6,23±0,11    | 6,95±0,3  | n.k.      |
| Muskotályzsálya                                  |          |           |              | 6,62±0,15    |              | 6,7±0,1      |            |              | n.k.       |              | n.k.      |           |
| Fahéjaldehid                                     | 7,49±0,1 | 7,32±0,1  | 6,62±0,2     | 6,79±0,12    |              |              |            |              |            |              |           |           |
| Terpinén-4-ol                                    |          |           |              |              |              |              |            | 7±0,2        |            | 7,04±0,12    | 6,9±0,3   | n.k.      |
| Linalool                                         |          |           | 7,04±0,2     |              | n.k.         | n.k.         |            | n.k.         |            |              |           |           |
| <i>S. aureus</i> log <sub>10</sub> TKE/ml        |          |           |              |              |              |              |            |              |            |              |           |           |
| Fahéj                                            |          |           | 7 ±0,4       | 7,04±0,2     |              |              | n.k.       |              | n.k.       |              |           |           |
| Majoránna                                        |          |           |              |              |              |              |            | 7± 0,11      |            | 7,04±0,3     | 7,04±0,31 | 5,34±0,21 |
| Muskotályzsálya                                  |          |           |              | 7,04±0,1     |              | 6,9±0,12     |            |              |            |              |           |           |
| Fahéjaldehid                                     |          | 7,43±0,02 | 6,84±0,03    | 6,84±0,2     |              |              |            |              |            |              |           |           |
| Terpinén-4-ol                                    | 7,36±0,1 |           |              |              |              |              |            | 7,32±0,1     |            | 7,23±0,4     | 7,04±0,33 | n.k.      |
| Linalool                                         |          |           | 6,84±0,1     |              | n.k.         | n.k.         |            | n.k.         |            |              |           |           |

n.k.-nem kimutatható

### Kevert biofilmek – *L. monocytogenes* + *P. putida*

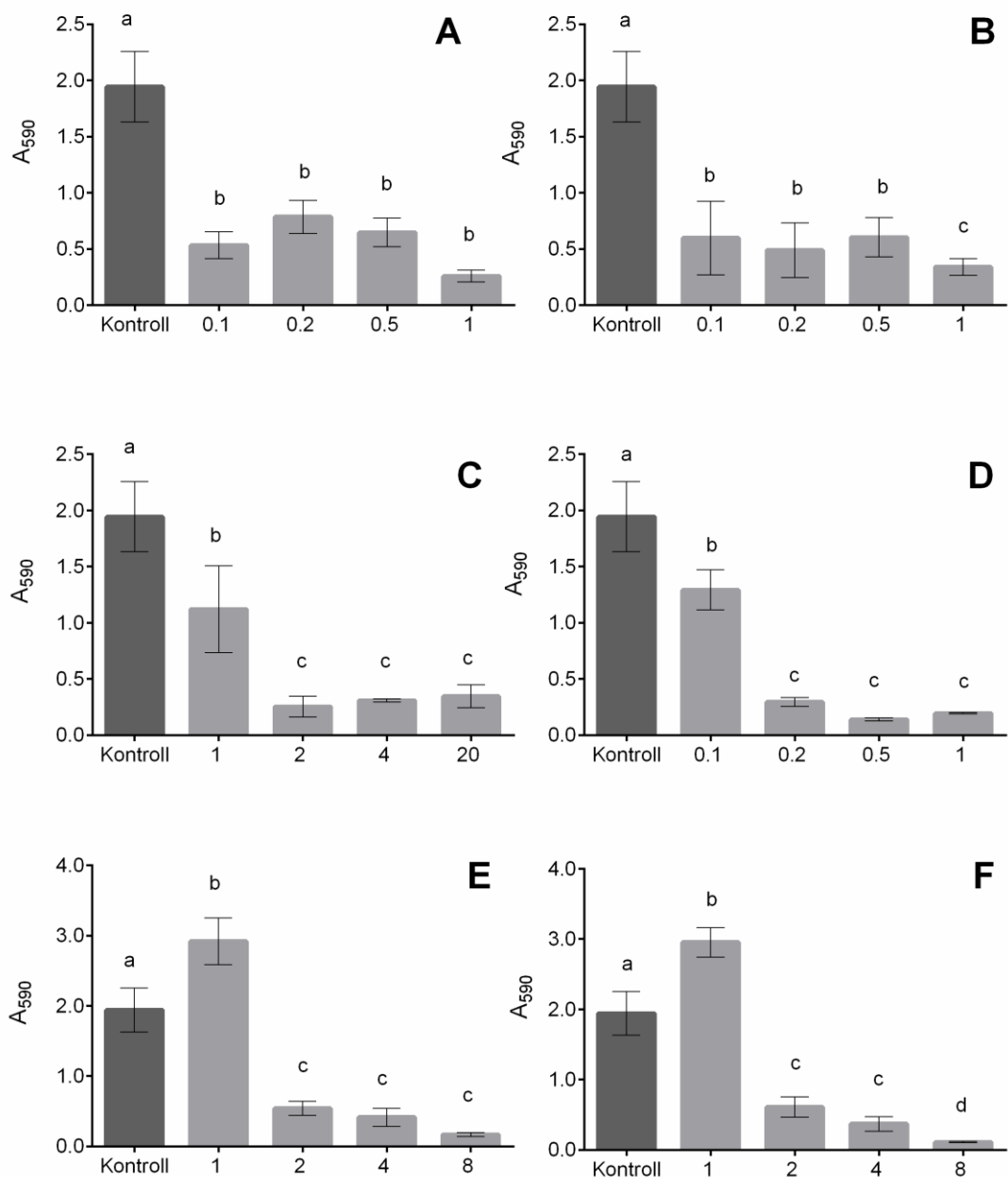
Az olajok MIC értékeit az 12. táblázat a kezelések utáni sejtszámokat pedig a 13. számú táblázat tartalmazza.

12. táblázat. Illóolajok és fő komponenseik MIC értékei *L. monocytogenes* és *P. putida* esetében (mg/ml).

| Illóolaj és komponensek | <i>L. monocytogenes</i> | <i>P. putida</i> |
|-------------------------|-------------------------|------------------|
| Fahéj                   | 1                       | 0,25             |
| Majoránna               | 4                       | 2                |
| Kakukkfű                | 2                       | 20               |
| Fahéjaldehyd            | 0,25                    | 0,25             |
| Terpinén-4-ol           | 4                       | 4                |
| Timol                   | 0,5                     | 0,5              |

A kontroll mintákban a *Listeria* sejtszám  $1 \times 10^8$  TKE/ml, míg a *P. putida* sejtszám  $1 \times 10^7$  TKE/ml volt. A fahéj gátlása 0,1 mg/ml-nél kezdődött, magasabb koncentrációk nem eredményeztek nagyobb mértékű gátlást, kivéve a legmagasabb koncentráció, ahol a sejtek elpusztultak. A *Listeria* a fahéj MIC értékénél nem volt kimutatható, míg a *P. putida* 5 log sejtszám mellett volt jelen. A fahéjaldehyd hatása hasonló volt az olajéhoz. A kakukkfű 1 mg/ml koncentrációnál gátolt, a többi koncentrációnál a *Listeria* nem volt kimutatható. A *P. putida* a legmagasabb koncentrációnál (20 mg/ml) is jelen volt 4 log sejtszámmal. Hasonlóan alakult a gátlás timol esetében is, azzal a kivétellel, hogy 1 mg/ml (2 x MIC mindkét törzsnél) koncentrációnál magasabb értékek esetében egyik törzs sem volt kimutatható. A majoránna gátló hatása koncentrációfüggő volt. A *P. putida* sejtszáma a legmagasabb koncentráció esetében is csak 2 log sejtszámcsökkenést mutatott a kontroll mintákhoz képest. A terpinén-4-ol már 4 mg/ml koncentrációnál eltüntette a *P. putida*-t a biofilmből (16. ábra, 13. táblázat).

Összességében a *P. putida* ellenállóbbnak bizonyult ebben a közösségben, ezt a jelenséget Giaouris és munkatársai (2013) által végzett kutatása is alátámasztja. A *P. putida* esetében azt is kimutatták, hogy képes felületaktív anyagokat illetve amfipatikus molekulákat termelni, amelyek gátolják a biofilmképzést, illetve lebontják a már meglévőket (Kuiper et al. 2004; Kruijt et al. 2009).



**16. ábra.** Illóolajok és komponenseik hatása a *L. monocytogenes*+*P. putida* kevert biofilmek képződésére. Az X tengelyen az illóolajok koncentrációja látható mg/ml-ben. **A:** Fahéj illóolaj; **B:** Fahéjaldehid; **C:** Kakukkfű illóolaj; **D:** Timol; **E:** Majoránna illóolaj; **F:** Terpinén-4-ol. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.



13. táblázat. A *L. monocytogenes* és *P. putida* kevert tenyészetek sejtszámai illóolajos kezelést követően.

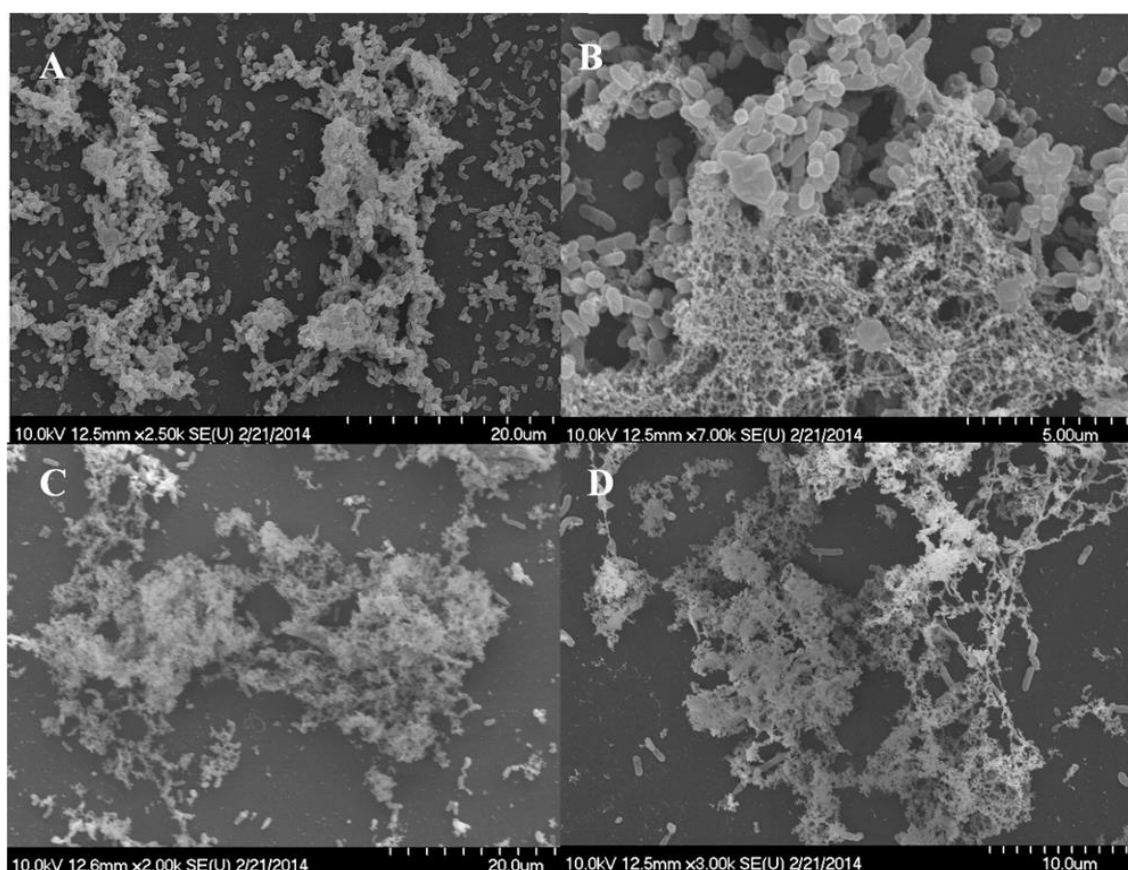
| <i>Listeria monocytogenes</i> log <sub>10</sub> TKE/ml |          |          |           |           |         |         |         |          |          |
|--------------------------------------------------------|----------|----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|----------|----------|
|                                                        | Kontroll | 0,1mg/ml | 0,2 mg/ml | 0,5 mg/ml | 1 mg/ml | 2 mg/ml | 4 mg/ml | 8 mg/ml  | 20 mg/ml |
| Fahéj                                                  |          | 5,7±0,2  | 5,6±0,1   | 5,6±0,3   | n.k.    |         |         |          |          |
| Majoránna                                              |          |          |           |           | 6,8±0,1 | 5,6±0,2 | 5±0,3   | 4,04±0,1 |          |
| Kakukkfű                                               |          |          |           |           |         |         |         |          |          |
| Fahéjaldehid                                           | 8±0,1    | 5±0,1    | 5,62±0,2  | 5,4±0,2   | n.k.    |         |         |          |          |
| Terpinén-4-ol                                          |          |          |           |           | 5±0,3   | 5±0,2   | 5±0,12  | n.k.     | n.k.     |
| Timol                                                  |          | n.k.     | n.k.      | n.k.      | 5±0,1   |         |         |          |          |
| <i>P. putida</i> log <sub>10</sub> TKE/ml              |          |          |           |           |         |         |         |          |          |
| Fahéj                                                  |          | 5±0,3    | 5,6 ±0,4  | 5,6±0,3   | 5,3±0,5 |         |         |          |          |
| Majoránna                                              |          |          |           |           | 6±0,2   | 5±0,1   | 5±0,2   | 5,4±0,2  |          |
| Kakukkfű                                               |          |          |           |           | 5,6±0,2 | 5,3±0,3 | 5±0,1   |          | 4,4±0,1  |
| Fahéjaldehid                                           |          | 5,6±0,02 | 5,6±0,03  | 5,6±0,3   | 5,3±0,1 |         |         |          |          |
| Terpinén-4-ol                                          | 7±0,1    |          |           |           | 5±0,2   | 5±0,2   | 5±0,4   | n.k.     |          |
| Timol                                                  |          | n.k.     | n.k.      | n.k.      | 5±0,2   |         |         |          |          |

n.k.-nem kimutatható

5.2.4 Illóolajok és fő komponenseik anti-biofilm hatásának vizsgálata pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek segítségével egyfajos és kevert közösségek esetében.

Egyfajos biofilmek SEM vizsgálata – *L. monocytogenes*

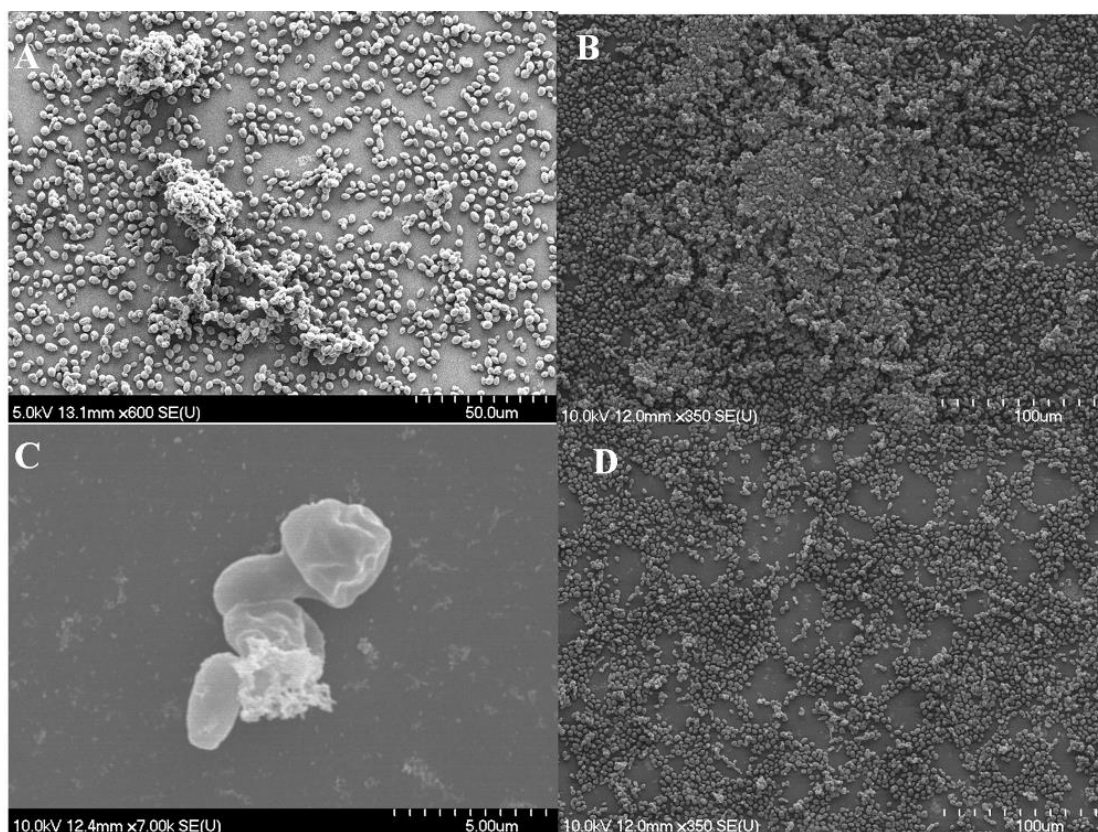
A kontroll mintákon az érett biofilmekre jellemző specifikus háromdimenziós struktúrák láthatók: szorosan egymáshoz tapadt sejtek, „csatornák” ahol a tápanyagok és bomlástermékek keringenek valamint a mátrix, amely a sejtek EPS termelése révén keletkezik, és amely biztosítja számukra a beágyazódást. Hasonló megfigyeléseket tettek Doijad és munkatársai (2015) is. Muskotályzsályaival és linaloolal való kezelést követően jelentős változásokat figyeltünk meg. A mátrixból eltűntek a sejtek, a háromdimenziós szerkezet helyett csak néhány, a felülethez tapadt sejt figyelhető meg, melyek egy része torzult, sérült (17. ábra).



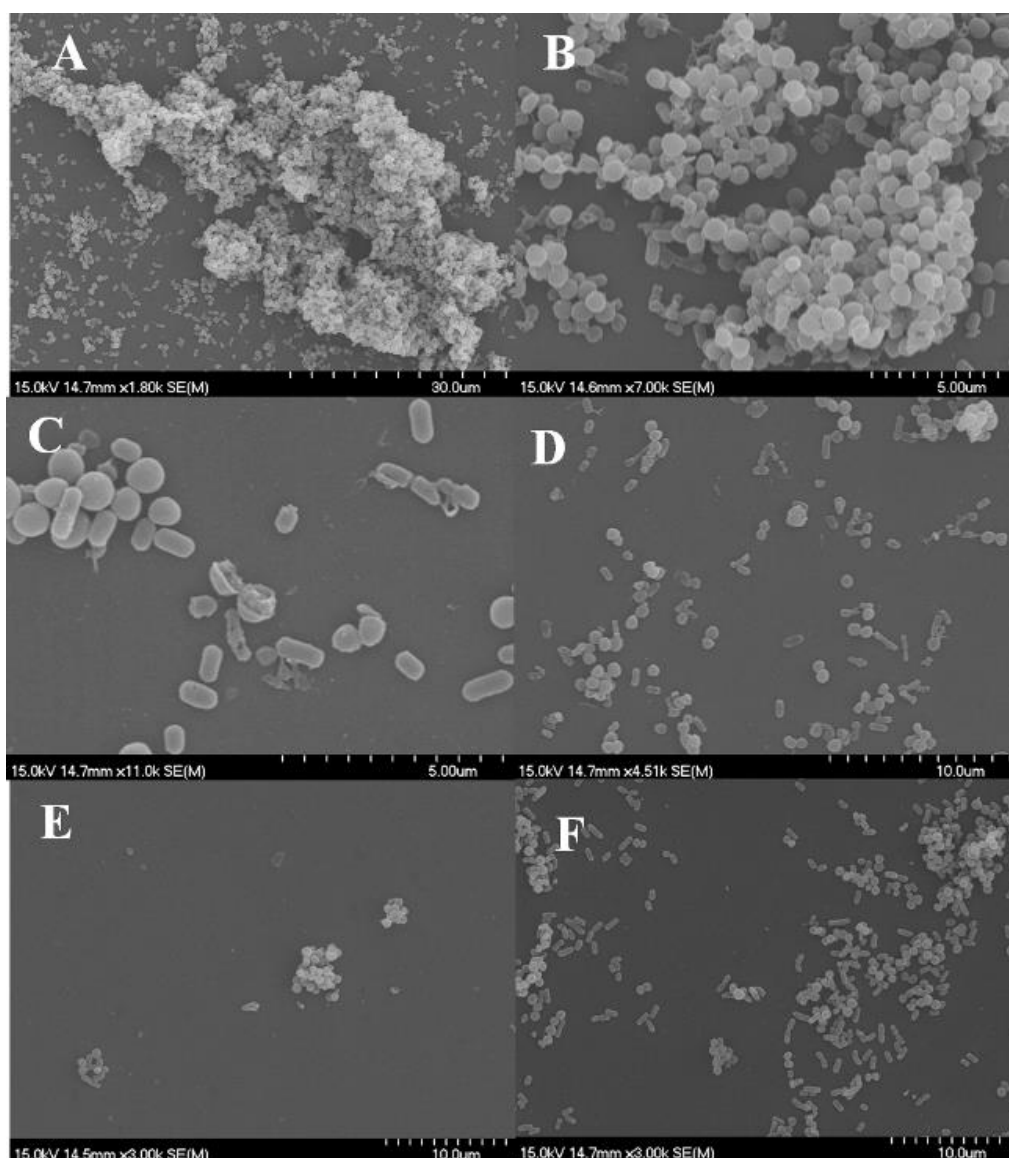
**17. ábra.** *L. monocytogenes* biofilmek SEM felvétele. **A és B:** Kontroll; **B:** Muskotályzsálya illóolaj (MIC/2:40 mg/ml); **C:** Linalool (MIC/2: 2,5 mg/ml).

### Egyfajos biofilmek SEM vizsgálata – *P. anomala*

A *P. anomala* élesztőgomba által alkotott 24 órás biofilmek struktúrája szintén az érett biofilmek mintázatát mutatja annak ellenére, hogy itt nem annyira szembetűnő a sejteket körülvevő mátrix. Boróka illóolajjal való kezelést követően a biofilmre jellemző formák eltűnnek és a sérült sejtek száma jelentősen megnő. Közelebbről megvizsgálva ezeket észrevehető, hogy az illóolaj jelentős károkat okoz a sejtfaon, amelynek következtében a beltartalom kifolyik. Az  $\alpha$ -pinén-es kezelés nem okozott jelentős sejtszám csökkenést azonban a háromdimenziós, érett biofilm szerkezet kétdimenziósra változott (18. ábra).



**18. ábra.** *P. anomala* biofilmek SEM felvétele. **A és B:** Kontroll; **C:** Boróka illóolaj (MIC/2: 0,25 mg/ml); **D:**  $\alpha$ -pinén (MIC/2: 0,5 mg/ml).



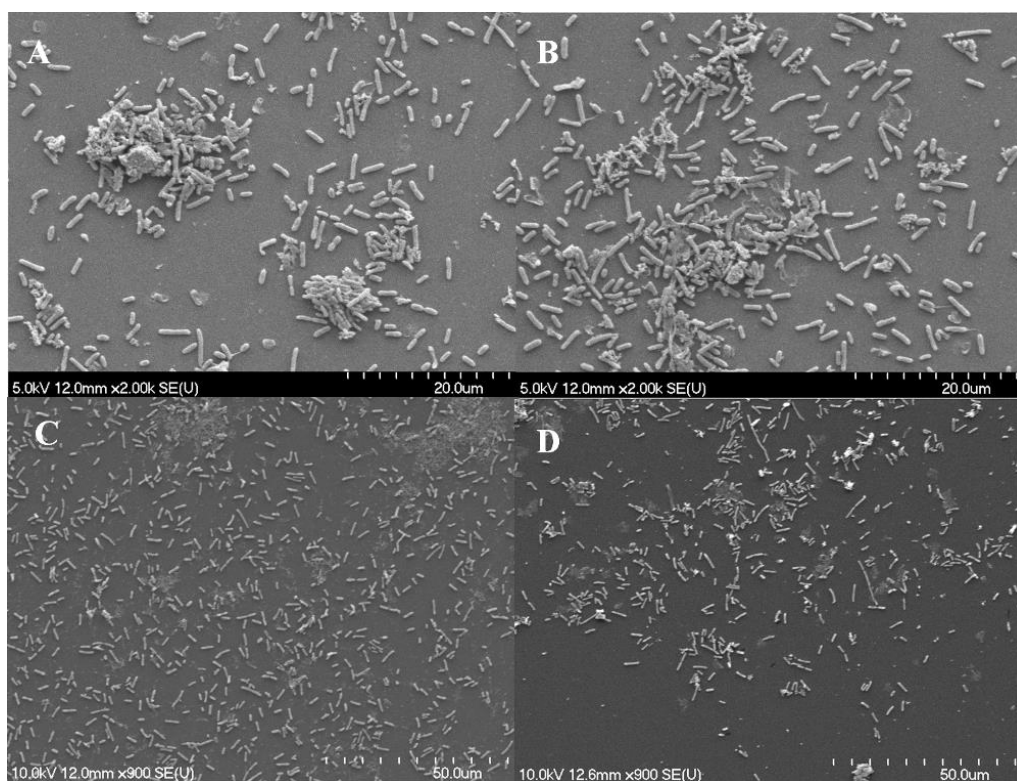
**19. ábra.** *L. monocytogenes* and *S. aureus* kevert biofilmek SEM felvétele. **A és B:** Kontroll; **C:** Majoránna illóolaj (1,6 mg/ml); **D:** Terpinén-4-ol (8 mg/ml); **E:** Kakukkfű illóolaj (0,4mg/ml); **F:** Timol (0,8mg/ml).

Az 19. ábra A és B jelzésű képein látható a *Listeria*+*Staphylococcus* kezeletlen kevert közösség SEM felvétele. A B képen észrevehető, hogy a *Staphylococcus*-ok vannak többségben a biofilmben és itt is az érett biofilmekre jellemző specifikus háromdimenziós struktúrák láthatók. Rieu és munkatársai (2008) is beszámoltak arról, hogy a két mikroba előszeretettel képez kevert tenyészetes biofilmeket rozsdamentes acélon. Kezeléseket követően ez a struktúra szétesik, sérült sejtek és mikrokolóniák vannak jelen a

látómezőkön. A majoránnával kezelt mintán egy „felhasadt” kokkus is kivehető, jelezve az illóolajok sejtfalra kifejtett káros hatását. Ugyanakkor a kezelt minták mindegyikén megjelennek citoplazma nélküli sejtek (sejtfalak) a felülethez tapadva. Ezek később megtapadási felületként szolgálnak az újonnan letapadó sejtek számára.

#### Kevert biofilmek SEM vizsgálata – *E.coli* + *P. putida*

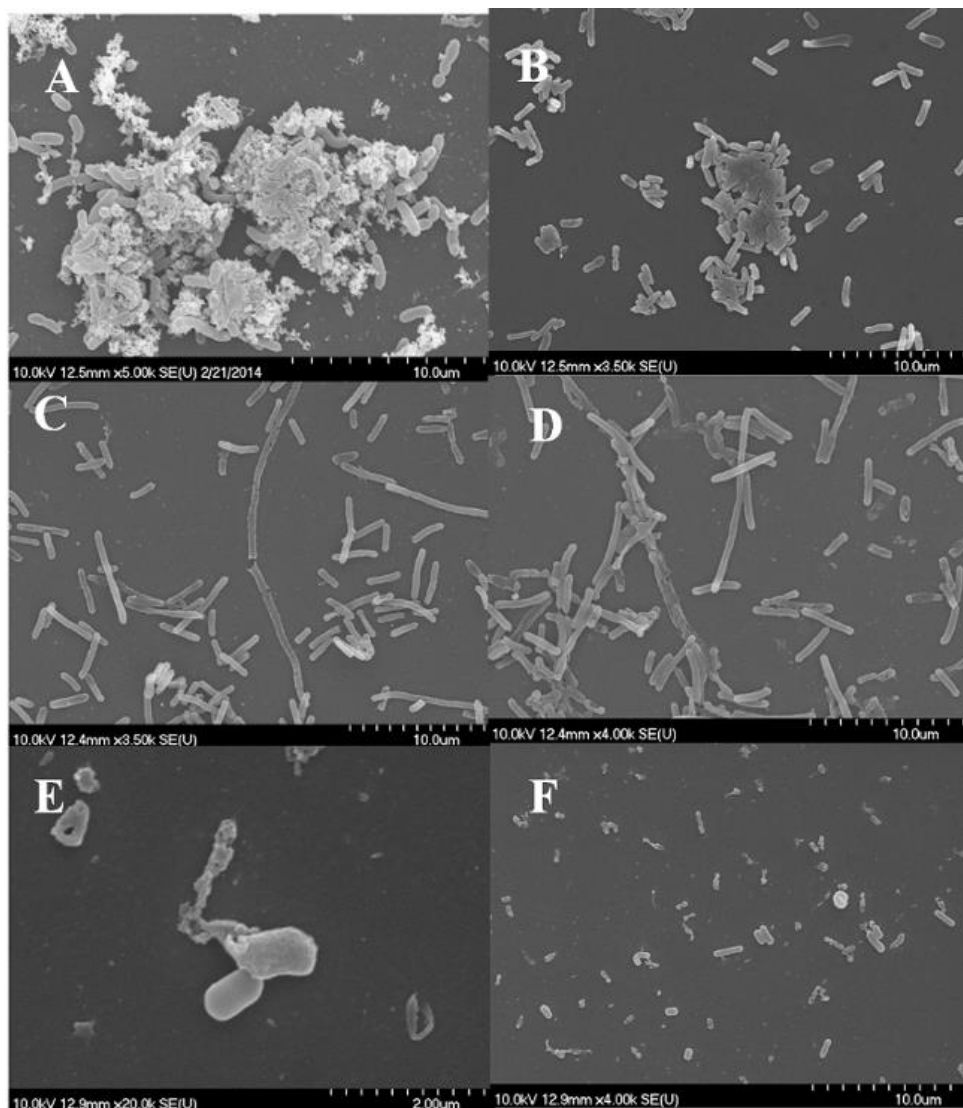
A G-negatív *E. coli* és *P. putida* baktériumok által képzett kezeletlen biofilmek esetében a háromdimenziós szerkezet kialakulásának kezdetét láthatjuk 24 órás inkubációt követően. A különbség a kezelt mintáktól azonban itt is szembetűnő; illóolajok hatására a háromdimenziós szerkezet eltűnik, a sejtek nem tapadnak egymáshoz. A D ábrán a fahéjjal kezelt minták esetében észrevehető néhány megnyúlt sejt, amelyek annak következtében alakulnak ki, hogy a sejtek osztódás után nem tudnak szétválni (Nazzaro et al. 2013) (20. ábra).



**20. ábra.** *E. coli* és *P. putida* biofilmek SEM felvétele. **A és B:** Kontroll; **C:** Citrom illóolaj (2 mg/ml); **D:** Fahéj illóolaj (0,1 mg/ml).

### Kevert biofilmek SEM vizsgálata – *L.monocytogenes* + *E. coli*

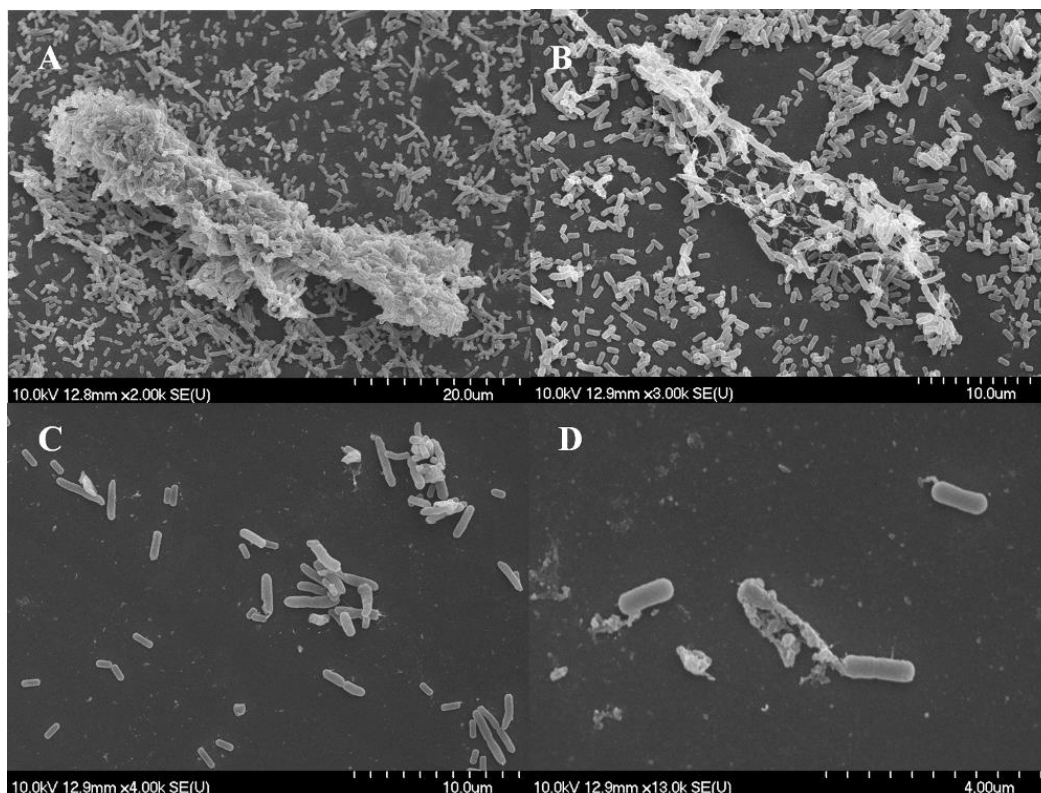
A 21. ábra A és B képein levő kontroll mintákon jól látható, hogy a *Listeria* + *E. coli* biofilm sejtei beágyazódnak az általuk termelt mátrix anyagba, amely összetartja a közösséget. A linaloolal kezelt mintákon a sérült sejtek mellett megnyúlt sejteket találunk, ezek esetében valószínűleg a sejtek nem tudnak szétválni az osztódás után; ezt a jelenséget több kutatás is igazolta az irodalomban (Domadia et al. 2007, Nazzaro et al. 2013) (21. ábra).



**21. ábra.** *L. monocytogenes* és *E. coli* biofilmek SEM felvétele. **A:** Kontroll; **B:** Muskotályzsálya illóolaj (0,5 mg/ml); **C és D:** Linalool (2,5 mg/ml; **E:** Kakukkfü illóolaj (0,5 mg/ml); **F:** Timol (0,1mg/ml).

### Kevert biofilmek SEM vizsgálata – *L. monocytogenes* + *P. putida*

A *Listeria* és *P. putida* kezeletlen mintáin a már megszokott, háromdimenziós biofilm struktúrák jelennek meg, emellett a B képen láthatók a mátrix szálak, amelyek összetartják a sejteket. A kezelések ebben az esetben is eltüntették ezeket a struktúrákat, a látómezőkön sérült, roncsolt sejtek láthatók (22. ábra).



**22. ábra.** *L. monocytogenes* and *P. putida* biofilmek SEM felvétele. **A és B:** Kontroll; **C:** Majoránna illóolaj (1 mg/ml); **D:** Terpinén-4-ol (1 mg/ml).

## **5.3 A QS mechanizmus vizsgálata**

### *5.3.1 AHL jelmolekulák kimutatása*

A laboratóriumi törzseink esetében a szakirodalomban meghatározottak szerint a G-negatív *E. coli* AI-2-t (Xavier és Bassler 2005; González Barrios et al. 2006), a *P. fluorescens* hosszú szénláncú (Cha et al. 1998), míg a *P. putida* rövid és hosszú szénláncú AHL-eket is termel (Degrassi et al. 2002).

Az 14. táblázat összefoglalja az általunk használt indikátor törzsek fő tulajdonságait.

14. táblázat. A felhasznált bioszenzor törzsek tulajdonságai.

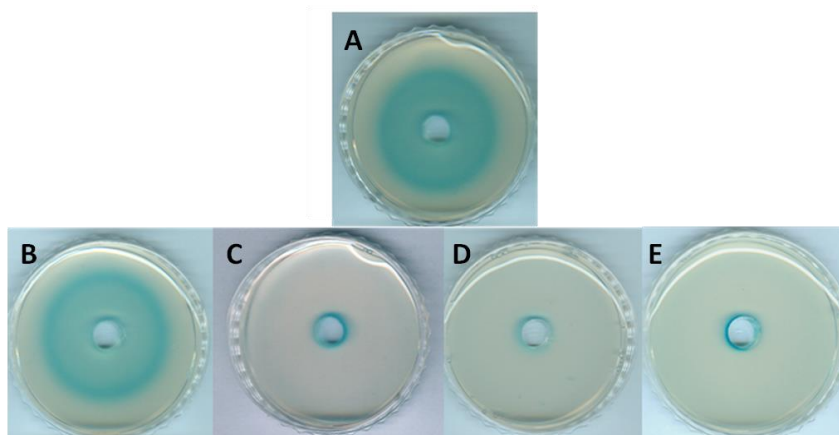
| Indikátor törzs                    | Indukált fenotípus QS<br>jelmolekula jelenlétében             | Érzékelt jelmolekula              |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>C. violaceum</i> CV 026         | Lila elszíneződés a violacein pigment termelése következtében | C4-C6 szénlánc hosszúságú AHL     |
| <i>R. radiobacter</i> NTL4 (pZLR4) | Kék elszíneződés a lebontott X-gal következtében              | C6-C12 szénlánc hosszúságú AHL    |
| <i>E. coli</i> JM109 pSB535        | Lumineszcencia                                                | C4 szénlánc hosszúságú AHL        |
| <i>E. coli</i> JM109 pSB1075       | Lumineszcencia                                                | 3-oxo-C12 szénlánc hosszúságú AHL |

A zöldségekről és húsokról izolált baktériumok közül a G-negatív törzsek AHL jelmolekula termelését teszteltük. Az eredmények alapján a *C. violaceum* CV 026 mutáns bioszenzor törzs (rövid szénláncú C4-C6AHL jelmolekula detektálása) egyik izolátum esetében sem mutatott pozitív válaszreakciót. Hasonló eredmények születtek Blana (2010) munkája során, ahol hosszabb tárolási idő után sem kaptak válaszreakciót a CV 26 mutáns esetében.

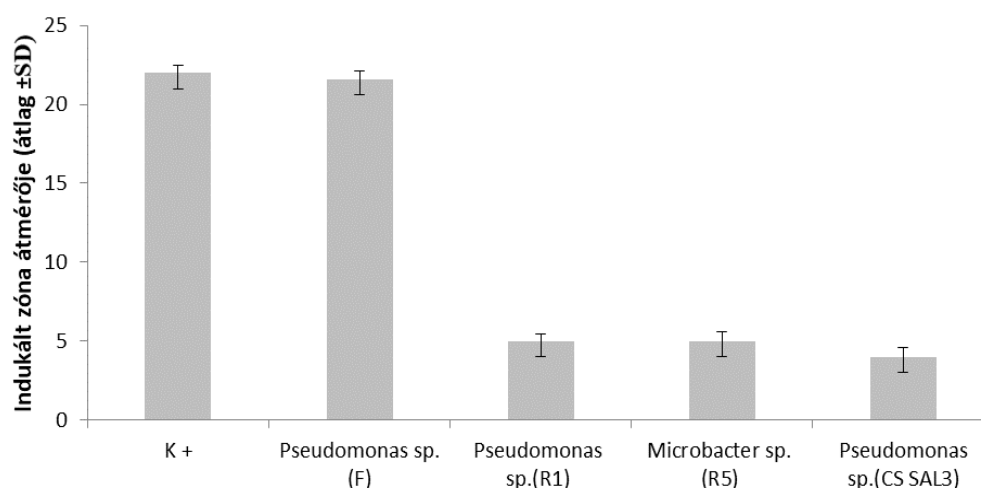
#### Jelmolekulák kimutatása *R. radiobacter* NTL4 (pZLR4) indikátor törzzsel

Az *R. radiobacter* NTL4 (pZLR4) (C6-C12 AHL jelmolekula detektálása) 4 törzs esetében adott pozitív válaszreakciót és a legnagyobb indukált zónát a csirkemellről izolált *Pseudomonas sp.* törzs adta (23 és 24 ábrák).





**23. ábra.** AHL jelmolekula jelenlétének kimutatása lyukdiffúzióval *R. radiobacter* NTL4 (pZLR4) segítségével. A kék elszíneződés jelzi az X-gal hidrolízisét és a C6-C12 AHL jelenlétét. **A:** Kontroll (*R. radiobacter* AT6); **B:** *Pseudomonas* sp (egyéni kód: F).; **C:** *Pseudomonas* sp (egyéni kód: R1).; **D:** *Microbacter* sp (egyéni kód: R5).; **E:** *Pseudomonas* sp (egyéni kód: CS SAL 3).

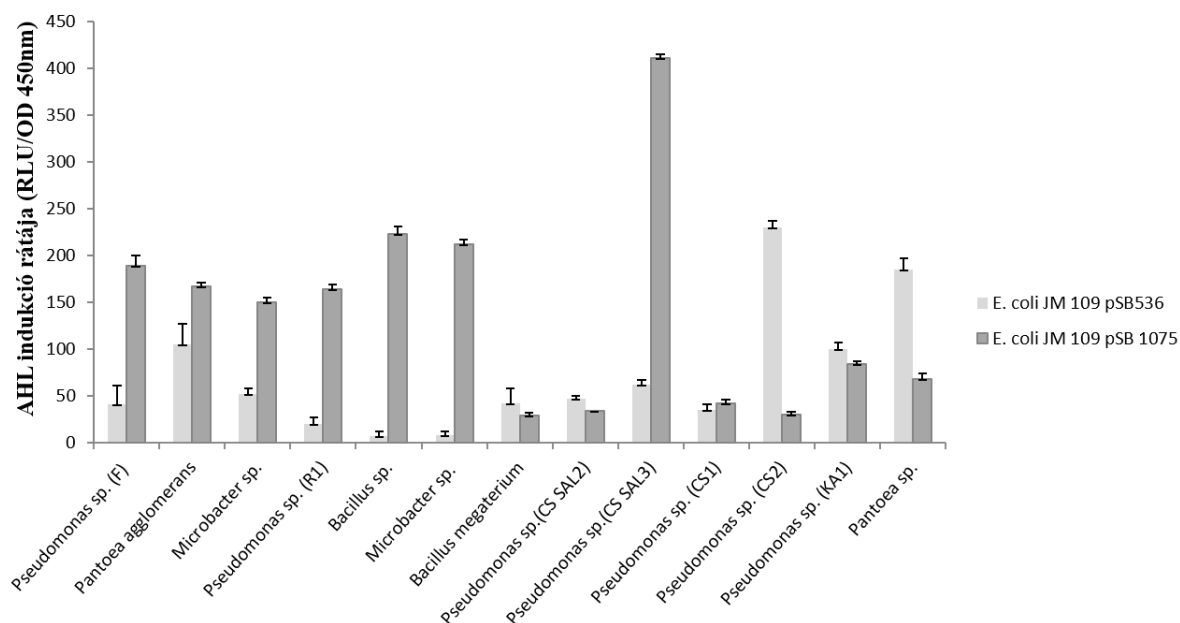


**24. ábra.** AHL jelmolekula jelenlétének kimutatása *R. radiobacter* NTL4 (pZLR4) segítségével.

Az AHL jelmolekulák lumineszcenciával történő kimutatását a 25. ábra foglalja össze. Ezek alapján csirkemellről izolált *Pseudomonas* sp. és *Pantoea agglomerans* hosszú, míg a kacsamellekről izoláltak (*Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp.) inkább rövid szénláncú jelmolekulákat termeltek. Fontos kiemelni, hogy Chalupowicz és munkatársainak (2008) sikerült úgy C4 mint C6 hosszúságú AHL jelmolekulákat kimutatni *P. agglomerans* esetében. Jelen dolgozatban, a két *Pantoea* nemzetség tagjainál csak egyik hosszúságú jelmolekula volt detektálható mintánként. A paprikáról, retekről és csomagolt salátáról

izolált törzseknél szintén hosszú, míg a csirakeverék egyik törzsénél rövid jelmolekulákat detektáltunk. Az *R. radiobacter* NTL4-el kapott eredmények megerősítésre kerültek ezen mérések alapján, ahol az *Pseudomonas* sp. (csirkemell), *Bacillus* sp. (rettek), *Microbacter* sp. (rettek) és *Pseudomonas* sp. (csomagolt saláta) törzsek hosszú szénláncú AHL termelésre utaltak.

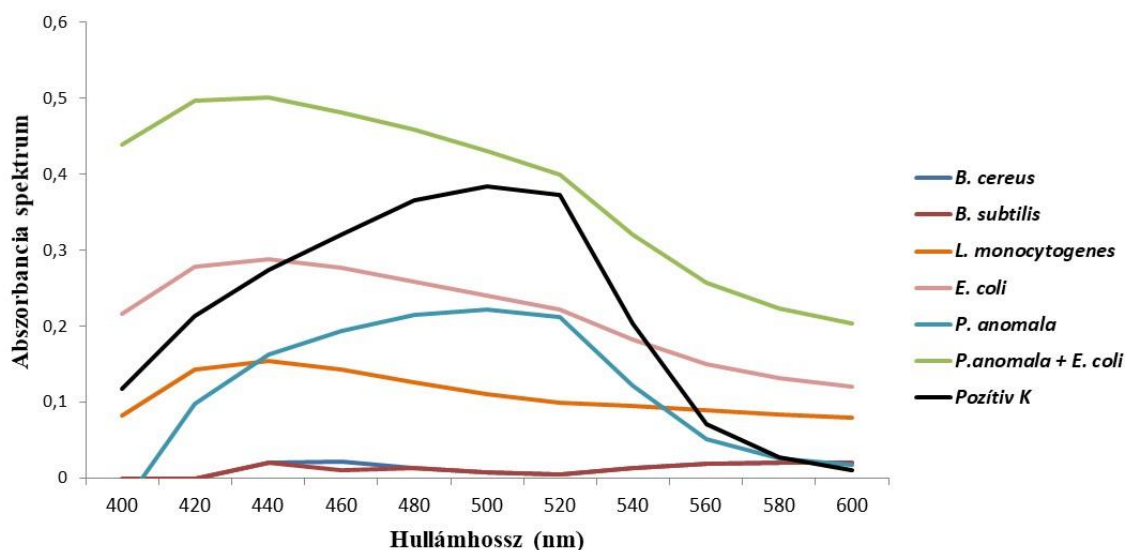
Fontos kiemelni, hogy egy adott jelmolekula hiánya nem feltétlenül jelenti azt, hogy az adott törzs nem termeli. Feltételezhető, hogy alacsony koncentrációban vannak jelen vagy olyan molekulákat termelhet amelyeket a bioszenzor törzsek nem tudnak kimutatni (Priha et al. 2011).



**25. ábra.** C4 és 3-oxo-C12 hosszúságú AHL jelmolekulák jelenlétének kimutatása *E. coli* JM 109 (pSB536) és *E. coli* JM 109 (pSB1075) törzsek segítségével.

### 5.3.2 AI-2 jelmolekulák kimutatása

Méréseink során az izolátumok egyike esetében sem tudtuk kimutatni az AI-2 jelenlétét (26. ábra). A kapott eredmények alapján a tesztelt egyfajos és kevert tenyészetek közül csak a *P. anomala* felülúszója mutatta a pozitív kontrollhoz hasonló mintázatot ahol 510 nm-en volt a maximális abszorpciós hullámhossz.

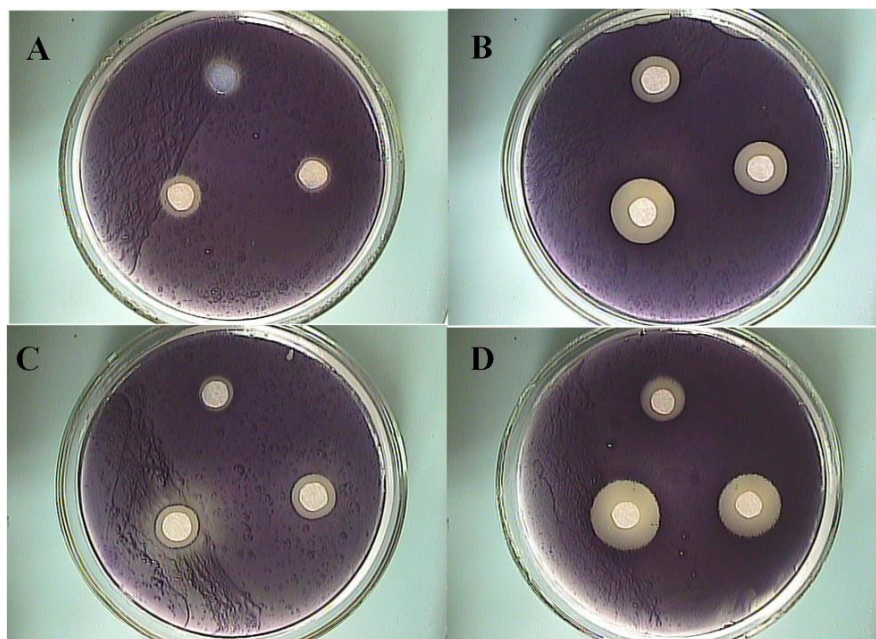


26. ábra. AI-2 jelmolekulák kimutatása 1,10 fenantrolin reagens használatával.

### 5.3.3 Illóolajok és fő komponenseik anti-QS hatásának vizsgálata

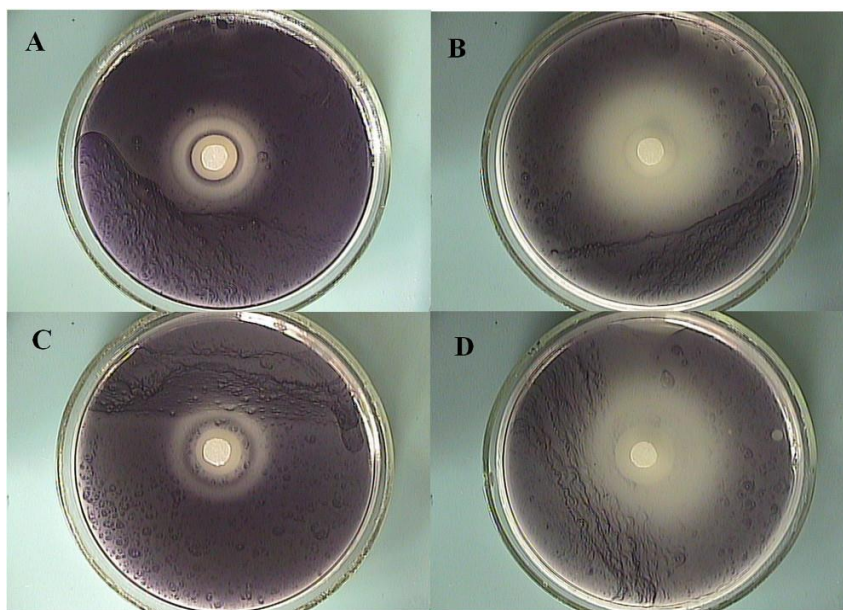
#### Anti-QS hatás kimutatása papírkorong diffúziós módszerrel

A növekedésgátlást jelző és szintelen sejteket tartalmazó zónák a 15. táblázatban láthatók. A kontroll esetében, a csészékre helyezett korongot teljesen benőtte a baktérium és nem volt zavar a színanyag termelésben. A felhasznált olajok mindegyike esetében észleltünk QS gátlást, ami általában koncentrációfüggő volt. A citromolaj esetében megfigyelhető, hogy a QS gátlás minimális, a limonén esetében pedig egyáltalán nem észleltünk QS gátlást (27. ábra). A limonén mennyiségének növekedésével csak a gátlási zónák nagysága nőtt, de nem jelent meg a QS gátlás. A boróka esetében megfigyelhető, hogy a QS gátlás mennyiségfüggő és mindegyik esetben az illóolaj jobb QS gátló, mint fő komponense, az  $\alpha$ -pinén (27. ábra).

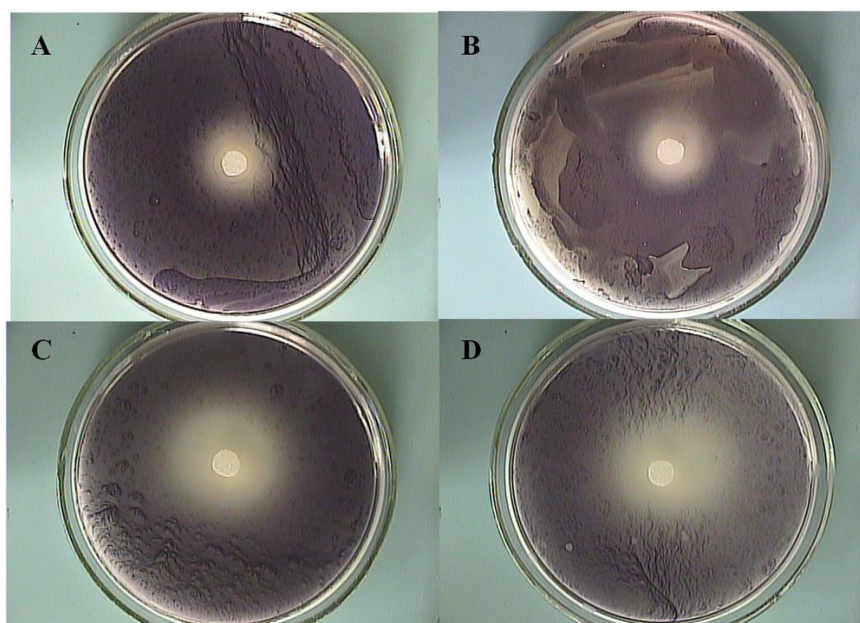


**27. ábra.** A citrom (A), limonén (B), boróka (C) és  $\alpha$ -pinén (D) illóolajok anti-QS hatása papírkorong-diffúziós módszerrel. A szűrőpapírkorongokon 1-3  $\mu$ l olaj található, a csúcsból kiindulva és az óramutató járásával megegyezően haladva.

A majoránna olaj és fő komponense mutatta a legjobb QS gátlást, és mindkettőnél a legjobb gátlást 2  $\mu$ l-nél érték el. Ebben az esetben is az olaj hatásosabb volt, mint a komponense (28. ábra). A muskotályzsálya olaj a második legjobb QS gátlónak bizonyult, a komponens hatása ebben az esetben is gyengébb volt. A legjobb gátlást 3  $\mu$ l-nél érték el (29. ábra).



**28. ábra.** A majoránna és terpinén-4-ol illóolajok anti-QS hatása papírkorong-diffúziós módszerrel. **A:** majoránna 1 µl; **B:** majoránna 2 µl; **C:** terpinén-4-ol 1 µl; **D:** terpinén-4-ol 2 µl.

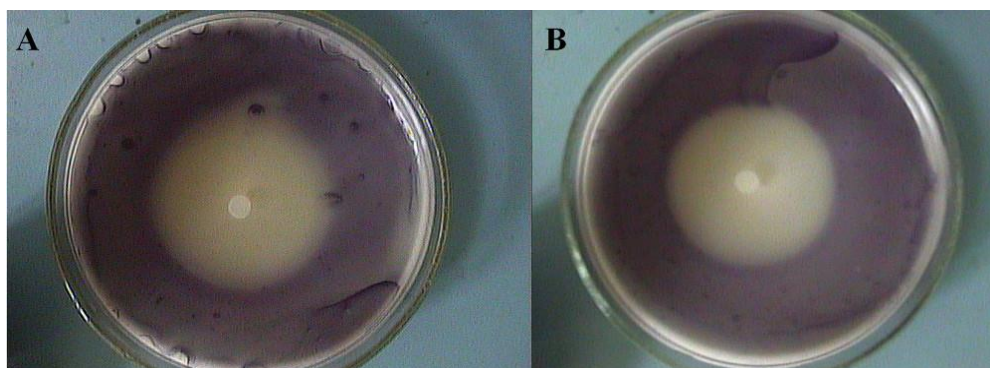


**29. ábra.** A muskotályzsálya és linalool illóolajok anti-QS hatása papírkorong-diffúziós módszerrel. **A:** muskotályzsálya 1 µl; **B:** linalool 1 µl; **C:** muskotályzsálya 2 µl; **D:** linalool 2 µl.

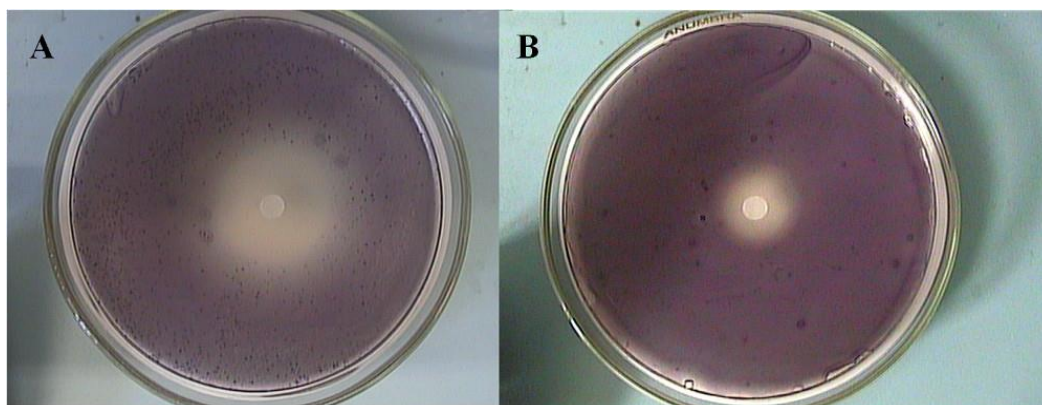
A fahéj és komponense esetében a tömény illóolaj olyan erőteljes növekedésgátlást mutatott, hogy szükség volt a hígításra. Felező és negyedelő hígítást követően már láthatóvá váltak a szintelen, QS gátlást jelző zónák is (30. ábra). A kakukkfű QS gátló



hatása is nőtt a felhasznált mennyiséggel, és a timol is mutatott QS gátlást 100 mg/ml és 10 mg/ml koncentrációnál is (31. ábra).



**30. ábra.** A fahéj és fahéjaldehyd illóolajok anti-QS hatása papírkorong-diffúziós módszerrel. **A:** fahéj  $\frac{1}{4}$  hígításban 1  $\mu$ l; **B:** fahéjaldehyd  $\frac{1}{4}$  hígításban 1  $\mu$ l.



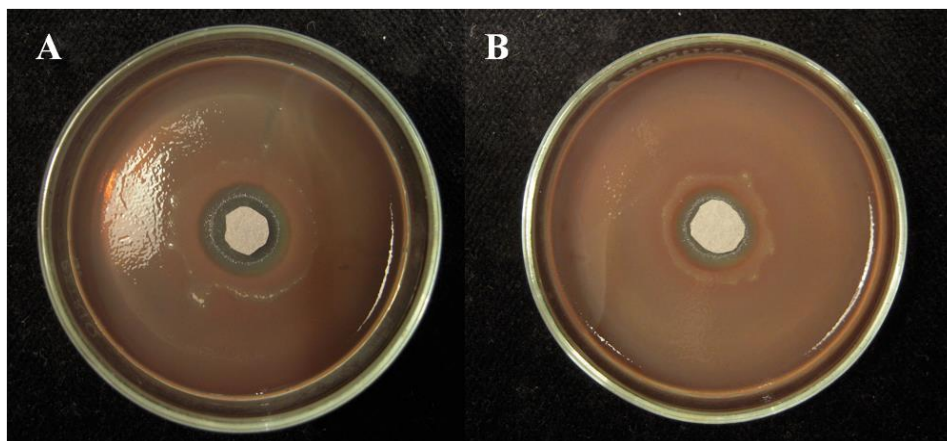
**31. ábra.** A kakukkfű és timol illóolajok anti-QS hatása papírkorong-diffúziós módszerrel. **A:** kakukkfű 1  $\mu$ l; **B:** timol 100 mg/ml koncentrációban 1  $\mu$ l.

Khan és munkatársai (2009) hasonló körülmények között a kakukkfűvet és fahéjat vizsgálva csak utóbbinál mutattak ki anti-QS hatást. Ahmad és munkatársai (2015) számos illóolaj összetevőt tesztelt a *C. violaceum* AHL termelésére, köztük az  $\alpha$ -pinén és limonén nem gátolt, a timol (0,03 mg/ml, 12 mm gátlási zóna) és linalool (0,25 mg/ml, 11 mm gátlási zóna) viszont hatékony gátlószernek bizonyultak. Mi is hasonló eredményeket kaptunk, azonban fontos kiemelni, hogy a szerzők a minimális QS gátló koncentrációval dolgoztak, esetünkben a tömény olajok kerültek megvizsgálásra.

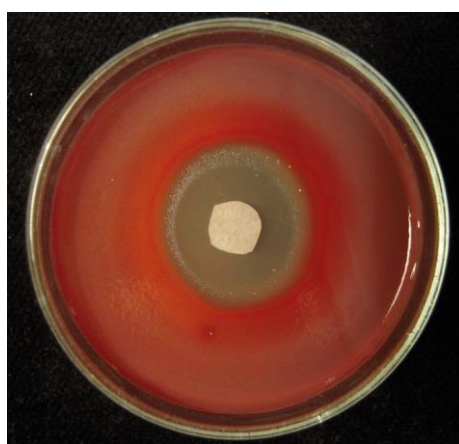
15. táblázat. Illóolajok és komponenseik növekedést gátló és anti-QS hatása *C. violaceum* 85 WT esetében. Az eredmények átlag $\pm$ SD formában láthatók.

| Illóolajok/<br>Komponensek   | Növekedésgátlás |                 |                 | QS gátlás      |                |                |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
|                              | (mm)            |                 |                 | (mm)           |                |                |
| Felvitt mennyiség ( $\mu$ l) | 1               | 2               | 3               | 1              | 2              | 3              |
| Muskotályzsálya              | 4 $\pm$ 0,50    | 4 $\pm$ 0,57    | 4 $\pm$ 0,50    | 10 $\pm$ 0,00  | 20 $\pm$ 0,50  | 25 $\pm$ 0,50  |
| Linalool                     | 5 $\pm$ 0,54    | 5 $\pm$ 0,00    | 3 $\pm$ 0,57    | 10 $\pm$ 0,00  | 15 $\pm$ 0,30  | 20 $\pm$ 0,57  |
| Citrom                       | 1 $\pm$ 0,50    | 2 $\pm$ 0,10    | 2.5 $\pm$ 0,20  | -              | 0,5 $\pm$ 0,20 | 1 $\pm$ 0,57   |
| Limonén                      | 4 $\pm$ 0,00    | 7 $\pm$ 0,11    | 6.5 $\pm$ 0,10  | -              | -              | -              |
| Marjoránna                   | 1 $\pm$ 0,00    | 3 $\pm$ 0,50    | 3 $\pm$ 0,00    | 10 $\pm$ 0,00  | 15 $\pm$ 0,10  | 20 $\pm$ 0,20  |
| Terpinén-4-ol                | 1 $\pm$ 0,50    | 2 $\pm$ 0,57    | 2 $\pm$ 0,00    | -              | 15 $\pm$ 0,00  | 20 $\pm$ 0,00  |
| Boróka                       | 2 $\pm$ 0,57    | 3 $\pm$ 0,00    | 3 $\pm$ 0,50    | -              | 10 $\pm$ 0,10  | 20 $\pm$ 0,50  |
| $\alpha$ -pinén              | 5 $\pm$ 0,00    | 5 $\pm$ 0,00    | 5 $\pm$ 0,00    | 1 $\pm$ 0,00   | 1 $\pm$ 0,50   | 1 $\pm$ 0,50   |
| Fahéj tömény                 | 17 $\pm$ 0,00   | 19 $\pm$ 0,50   | 18.5 $\pm$ 0,00 | -              | -              | -              |
| Fahéj 1/2                    | 17.5 $\pm$ 0,50 | 16.5 $\pm$ 0,57 | 17 $\pm$ 0,10   | 1 $\pm$ 0,50   | 1 $\pm$ 0,50   | 1 $\pm$ 0,50   |
| Fahéj 1/4                    | 13 $\pm$ 0,50   | 15 $\pm$ 0,50   | 15 $\pm$ 0,57   | 3 $\pm$ 0,00   | 1.5 $\pm$ 0,60 | 1 $\pm$ 0,57   |
| Fahéjaldehid                 | 18.5 $\pm$ 0,57 | 18 $\pm$ 0,00   | 19.5 $\pm$ 0,50 | -              | -              | -              |
| Fahéjaldehid 1/2             | 16.5 $\pm$ 0,56 | 17 $\pm$ 0,00   | 18.5 $\pm$ 0,50 | 1 $\pm$ 0,50   | 1 $\pm$ 0,00   | 1 $\pm$ 0,00   |
| Fahéjaldehid 1/4             | 15.5 $\pm$ 0,10 | 15.5 $\pm$ 0,00 | 18.5 $\pm$ 0,55 | 2.5 $\pm$ 0,50 | 1.5 $\pm$ 0,00 | 0.5 $\pm$ 0,00 |
| Kakukkfű                     | 12.5 $\pm$ 0,00 | 13 $\pm$ 0,00   | 14.5 $\pm$ 0,20 | 2 $\pm$ 0,10   | 2.9 $\pm$ 0,00 | 3 $\pm$ 0,50   |
| Timol 100 mg/ml              | 2.5 $\pm$ 0,00  | 7.5 $\pm$ 0,20  | 5 $\pm$ 0,20    | 1 $\pm$ 0,10   | 1 $\pm$ 0,00   | 1 $\pm$ 0,50   |
| Timol 10 mg/ml               | 1 $\pm$ 0,50    | 2 $\pm$ 0,10    | 3 $\pm$ 0,10    | -              | 1 $\pm$ 0,50   | 1 $\pm$ 0,10   |

Thomson és munkatársai (2000) írása alapján tudjuk, hogy a *S. marcescens* prodigiozin termelése QS szabályozás alatt áll. Azonban a baktérium QS mechanizmusának gátlására vonatkozóan, eddigi ismereteink szerint csak kevés nemzetközi eredmény van. Sikerült kimutatnunk, hogy a felhasznált olajok egy része hatékony QS gátlószer. A citrom és boróka illóolajok esetében, a csészékre helyezett korongot teljesen benőtte a baktérium, tehát ezek az olajok nem gátolták a QS mechanizmust. Ez volt jellemző fő komponenseikre is. A legtöbb illóolaj és komponens esetében nem találtunk QS gátló hatást és a növekedésgátlás is mérsékelt volt, vagy egyáltalán nem volt megfigyelhető. (32 és 33. ábrák, 16. táblázat).



**32. ábra.** A muskotályzsálya illóolaj anti-QS hatása papírkorong-diffúziós módszerrel. **A:** 1  $\mu$ l; **B:** 2  $\mu$ l.



**33. ábra.** A fahéj illóolaj (1  $\mu$ l) anti-QS hatása papírkorong-diffúziós módszerrel.

#### Anti-QS hatás kimutatása folyadéktenyészetekben

Az eredményeinket a 34. ábra tartalmazza. Legtöbb esetben elmondható, hogy a küszöbérték alatti koncentráció növelésével sikerült gátolni a pigment termelést egy viszonylag állandó sejtszám mellett. Citrom illóolaj esetében a tesztelt koncentrációk mindegyike gátolta a violacein termelését, a növekedést viszont nem. Fő komponense, a limonén hasonló hatást mutatott, de ebben az esetben magasabb koncentrációk mellett teljes növekedésgátlás is történt.

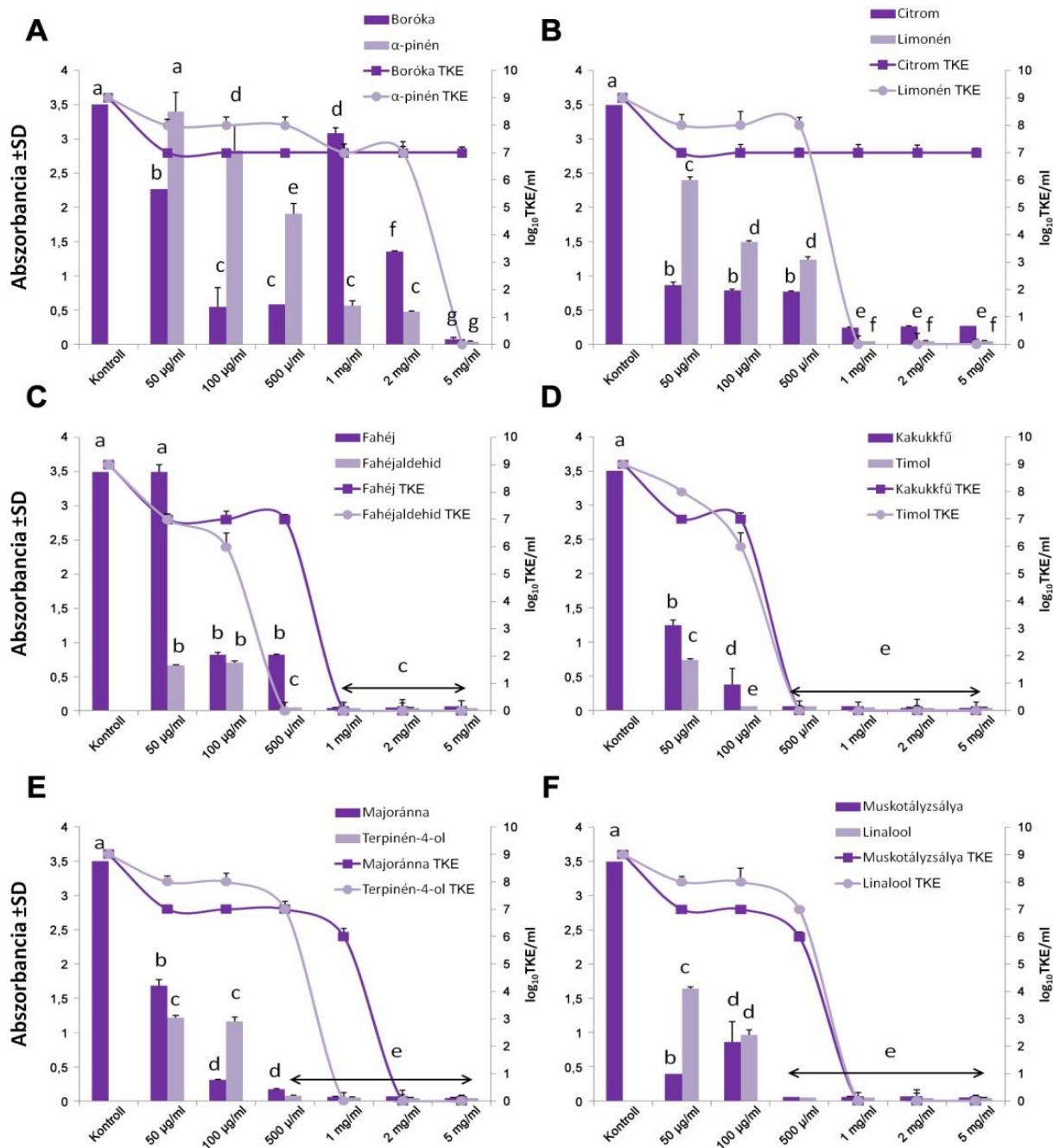
A borókával is szignifikáns QS gátlás történt, azonban érdekes módon 1 és 2 mg/ml esetében jelentősen megnőtt a termelt violacein mennyisége, és csak a legmagasabb koncentrációnál csökkent. Az  $\alpha$ -pinén hatása koncentrációfüggő volt, a QS gátlás 100  $\mu$ g/ml-nél kezdődött.



16. táblázat. Illóolajok és komponenseik növekedést gátló és anti-QS hatása *S. marcescens* esetében. Az eredmények átlag $\pm$ SD formában vannak feltüntetve.

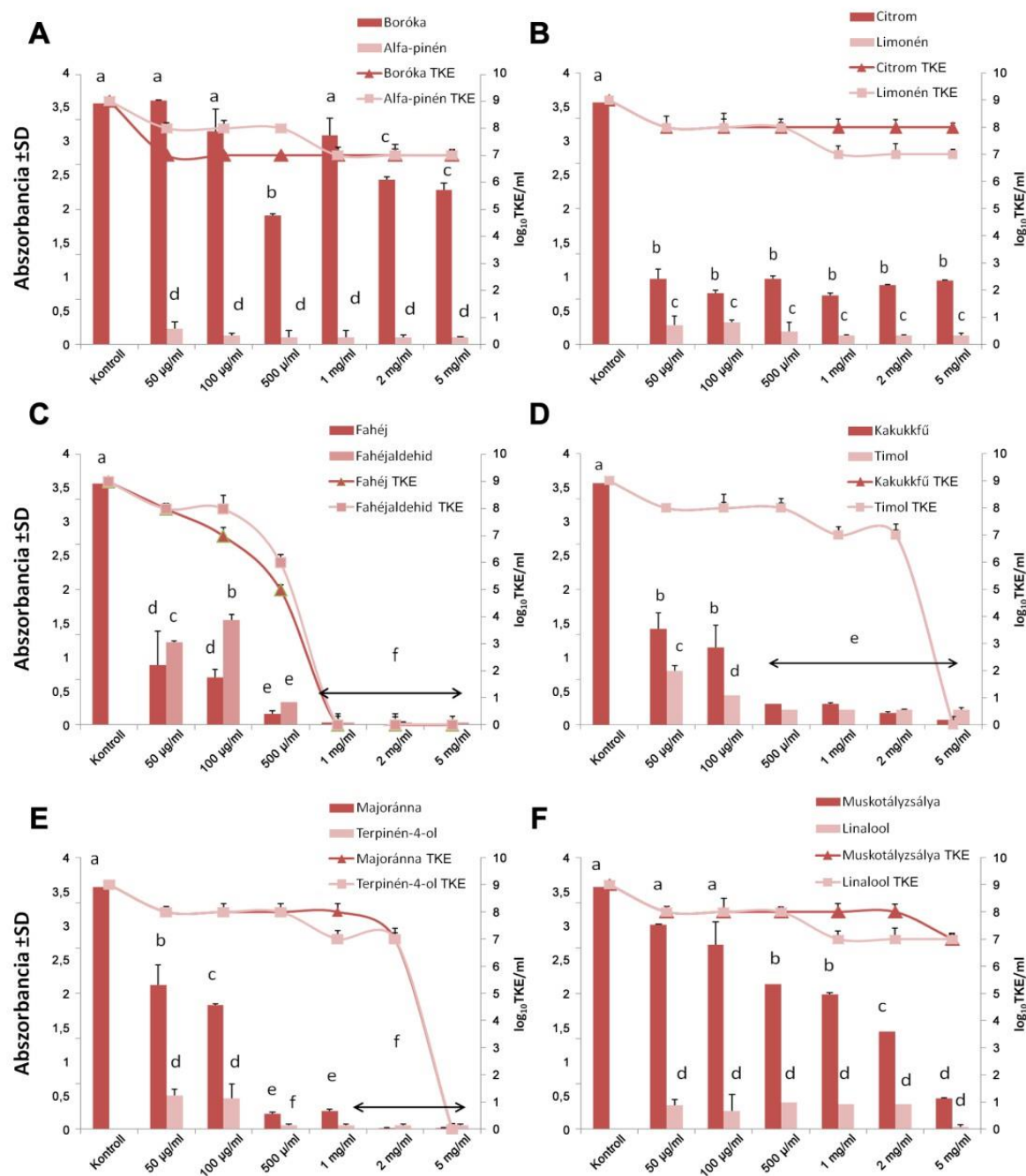
| Illóolajok/Komponensek | Növekedésgátlás<br>(mm) |                |                | Anti-QS gátlás<br>(mm) |              |                |
|------------------------|-------------------------|----------------|----------------|------------------------|--------------|----------------|
|                        | 1 $\mu$ l               | 2 $\mu$ l      | 3 $\mu$ l      | 1 $\mu$ l              | 2 $\mu$ l    | 3 $\mu$ l      |
| Muskotályzsálya        | -                       | -              | 1 $\pm$ 0,00   | 0,50 $\pm$ 0,00        | 1 $\pm$ 0,50 | 0,1 $\pm$ 0,50 |
| Linalool               | -                       | -              | -              | -                      | -            | -              |
| Citrom                 | -                       | -              | -              | -                      | -            | -              |
| Limonén                | -                       | -              | -              | -                      | -            | -              |
| Marjoránna             | -                       | -              | 0,5 $\pm$ 0,00 | -                      | -            | 0,1 $\pm$ 0,00 |
| Terpinén-4-ol          | -                       | -              | -              | -                      | -            | -              |
| Boróka                 | -                       | -              | -              | -                      | -            | -              |
| $\alpha$ -pinén        | -                       | -              | -              | -                      | -            | -              |
| Fahéj tömény           | 1 $\pm$ 0,00            | 17 $\pm$ 0,20  | 20 $\pm$ 0,10  | 0,5 $\pm$ 0,00         | -            | -              |
| Fahéj 1/2              | 1 $\pm$ 0,00            | 10 $\pm$ 0,60  | 15 $\pm$ 0,30  | 0,5 $\pm$ 0,50         | -            | -              |
| Fahéj 1/4              | -                       | 5 $\pm$ 0,30   | 10 $\pm$ 0,10  | -                      | -            | -              |
| Fahéjaldehid           | 1 $\pm$ 0,10            | 15 $\pm$ 0,00  | 18 $\pm$ 0,00  | -                      | -            | -              |
| Fahéjaldehid 1/2       | 1 $\pm$ 0,50            | 8 $\pm$ 0,00   | 8 $\pm$ 0,00   | -                      | -            | -              |
| Fahéjaldehid 1/4       | -                       | 6 $\pm$ 0,00   | 6 $\pm$ 0,00   | -                      | -            | -              |
| Kakukkfű               | 1,7 $\pm$ 0,50          | 1,8 $\pm$ 0,50 | 2 $\pm$ 0,50   | -                      | -            | 0,1 $\pm$ 0,50 |
| Timol 100 mg/ml        | 1,5 $\pm$ 0,55          | 1,6 $\pm$ 0,57 | 2 $\pm$ 0,00   | -                      | -            | -              |
| Timol 10 mg/ml         | 1 $\pm$ 0,60            | 1 $\pm$ 0,00   | 1,5 $\pm$ 0,00 | -                      | -            | -              |

Ebben az esetben a legmagasabb koncentráció sem okozott sejtszám csökkenést, csak a pigmenttermelés állt le. A majoránna és terpinén-4-ol valamint muskotályzsálya és linalool esetében a QS gátlás 1 mg/ml koncentrációig volt tapasztalható. Fahéj esetében 500 $\mu$ g/ml okozott még QS gátlást, magasabb koncentrációk már a növekedést is gátolták. A fahéjaldehid 50  $\mu$ g/ml koncentrációban jelentősebb pigment termelés gátlást eredményezett, mint az olaj. A kakukkfű és a timol teljes sejtszám csökkenést 500  $\mu$ g/ml koncentrációnál okozott, ettől alacsonyabb koncentrációk csökkentették a pigment mennyiségét. Ezek alapján a sejtszám csökkenése, azaz növekedésgátló hatás nélkül, már kimutatható volt anti-QS hatás, ami arra utal, hogy az illóolajok a jelmolekulák bioszintézisbe avatkoznak be.



**34. ábra.** A vizsgált illóolajok és komponenseik violacein termelést gátló hatása *C. violaceum* 85 WT folyadéktenyészetében: **A:** boróka illóolaj; **B:** citrom illóolaj; **C:** Fahéj illóolaj; **D:** kakukkfű illóolaj; **E:** majoránna illóolaj; **F:** muskotályzsálya illóolaj. Az oszlopok a pigmenttermelésre vonatkozó mért abszorbanciát mutatják 585 nm-en, míg a görbék a változó sejtszámot a koncentrációk függvényében. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

A *S. marcescens* esetében is növekedést gátló hatás nélkül már kimutatható volt anti-QS hatás. A citrom illóolaj és a limonén állandó sejtszám mellett koncentrációtól függetlenül szignifikánsan csökkentette a pigmenttermelést, a limonén nagyobb mértékben. A boróka illóolaj gyenge hatásával szemben az  $\alpha$ -pinén minden koncentrációnál gátolta a pigmenttermelést. A majoránna és komponense koncentrációtól függő módon csökkentette a pigmenttermelést. Hasonló hatást értünk el a kakukkfű és timol esetében is. A muskotályzsálya QS gátló hatása is koncentrációfüggő volt, a linalool pedig a legalacsonyabb koncentrációtól szignifikánsan gátolta a pigmenttermelést. Növekedésgátlást egyik esetben sem tapasztaltunk. A fahéj illóolaj és komponense esetében a növekedés és a színanyag termelés gátlása párhuzamosan zajlott, ezért nem található olyan koncentráció, ahol csak QS gátlásról beszélhetünk (35. ábra).

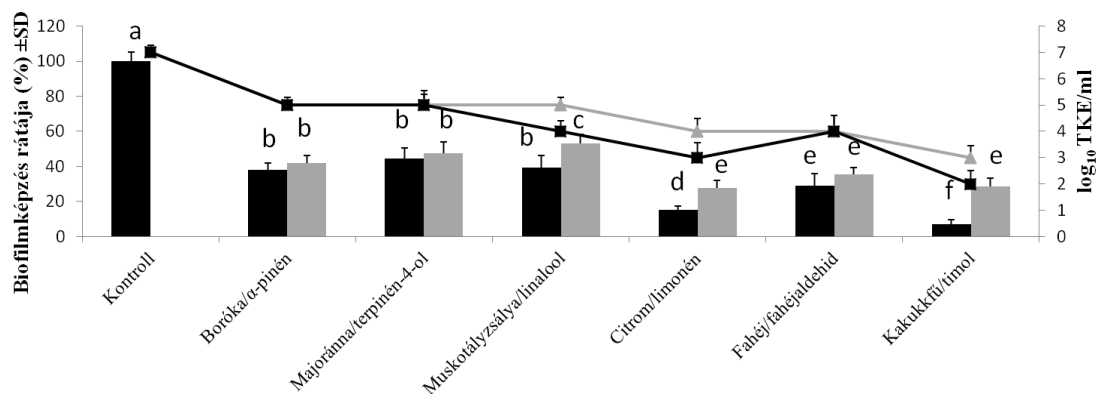


**35. ábra.** A vizsgált illóolajok és komponenseik prodigiozin termelés csökkentő hatása folyadéktenyészetben *S. marcescens* esetében. **A:** boróka illóolaj; **B:** citrom illóolaj; **C:** Fahéj illóolaj; **D:** kakukkfű illóolaj; **E:** majoránna illóolaj; **F:** muskotályzsálya illóolaj. Az oszlopok a mért abszorbanciát mutatják 585 nm-en, míg a görbék a változó sejtszámot a koncentrációk függvényében. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

### 5.3.4 A QS gátlás és biofilm képzés gátlás közti összefüggés vizsgálata

#### Illóolajok hatása előkezeletlen biofilmekre

Az 36. ábrán látható, hogy az illóolajok mindegyike szignifikánsan gátolta a *C. violaceum* biofilm képzését. A citrom (50 µg/ml), kakukkfű (50 µg/ml) és muskotályzsálya (50 µg/ml) illóolajok valamivel hatékonyabbak voltak, mint fő komponenseik. A biofilm képzés mellett a pigmenttermelési ráta is csökkent minden alkalmazott gátlószer esetében egy viszonylag állandó sejtszám mellett, jelezve azt, hogy növekedést gátló hatás nélkül, már kimutatható volt anti-QS hatás. Jelentős csökkenést a fahéj (100µg/ml), fahéjaldehid (50 µg/ml) és a timol (50 µg/ml) eredményeztek (37. ábra).

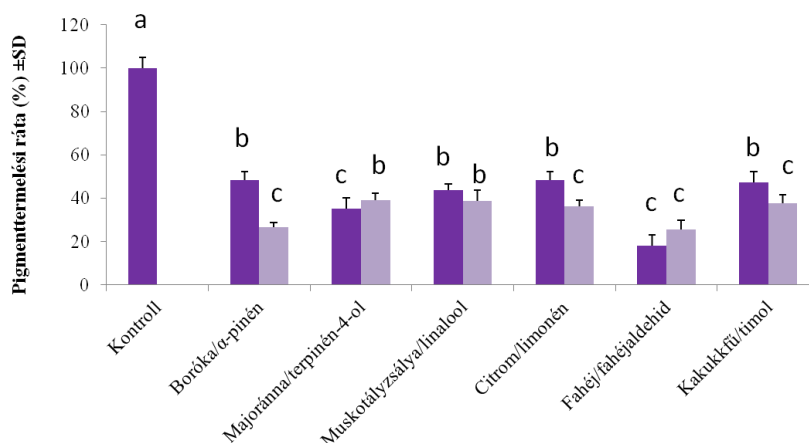


**36. ábra.** A *C. violaceum* 85 WT biofilmképzési rátája és sejtszámbeli változása illóolajokkal és komponenseikkel való kezelést követően nem előzekelt mintáknál. Az oszlopok (fekete: illóolaj; szürke: komponens) a biofilmképzési rátát, míg a vonalak (fekete: illóolaj; szürke: komponens) a sejtszám változását jelzik. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

#### Illóolajok hatása előkezelt biofilmekre

Az 37. ábra adatai az előkezelt minták eredményeit foglalják össze. Ha a 4 órás letapadási fázisban hozzáadtuk az olajokat a mintákhoz, sokkal kevesebb sejtnak sikerült megtapadnia és biofilmet képeznie annak ellenére, hogy a sejtszuspenzióban  $4 \times 10^6$  TKE/ml volt a sejtszám. A letapadt sejtek biofilmképzését a 24 órás kezelés tovább csökkentette, több mint 90%-os gátlást eredményezve. Ez alól kivételt képez a kakukkfű és

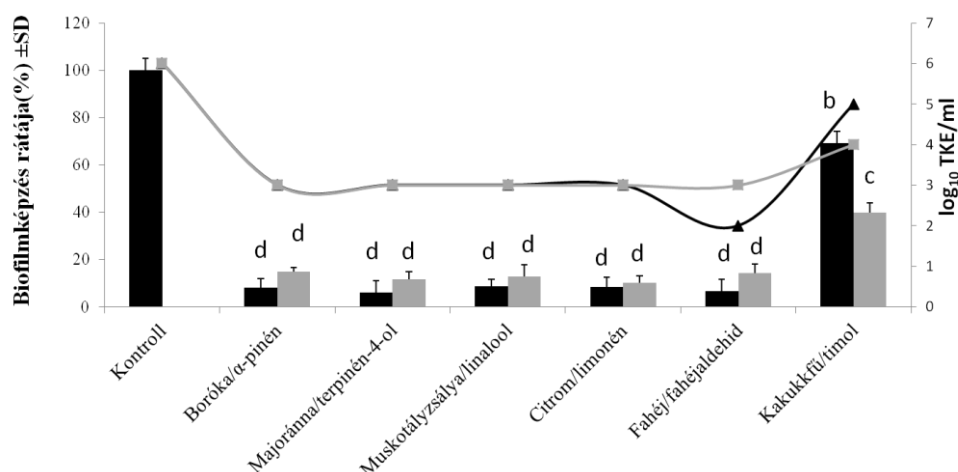
fő komponense, itt nem tapasztaltunk különbséget az előkezelt és nem előkezelt minták között.



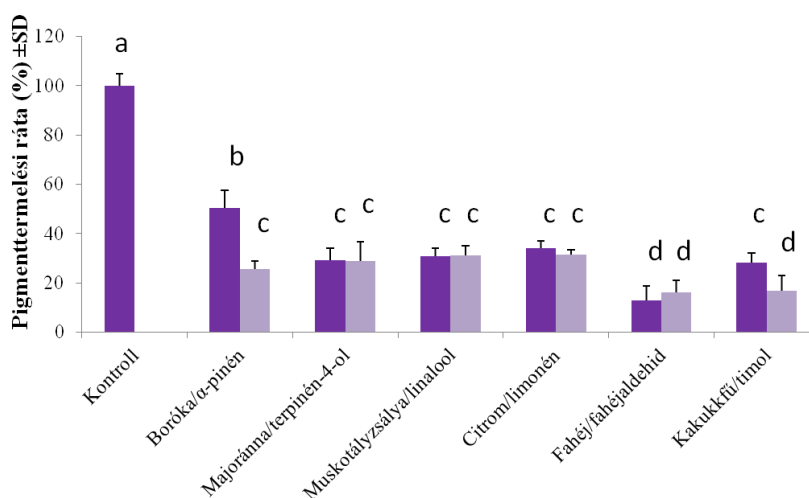
**37. ábra.** A *C. violaceum* pigmenttermelési rátája illóolajokkal és komponenseikkel való kezelést követően (sötétlila: illóolaj; világos lila: komponens). Az adatok a nem előkezelt (4 órás tapadáskor csak tápoldatot tartalmazó) minták eredményeit tartalmazzák. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

A pigmenttermelést a kezdetekben hozzáadott illóolaj nem befolyásolta, alacsony biofilmképzési ráta mellett a nem előkezelt csoport értékeihez hasonló adatokat regisztráltunk. Jelen esetben a kezelt minták sejtszáma 5 és 3 log között volt. Kivételt képez a fahéj és komponense ahol a biofilmképzés gátlása egyenesen arányos volt a pigmenttermelés gátlásával (a gátlás mértéke 80% fölötti mindkét folyamat esetében). A kakukkfű és komponensének pigmenttermelésre kifejtett hatása esetében 30 és 60%-os biofilmképzés gátlás mellett több mint 80%-os pigmenttermelés gátlás mutatkozott. A jelenség arra utalhat, hogy bár a sejtek képesek voltak a letapadásra, az előkezelés kihatott a QS rendszerre befolyásolva a színanyag termelést (39. ábra).

Összességében a kezelések csökkentették a *C. violaceum* pigmenttermelési rátáját rávilágítva arra, hogy a folyamatot szabályozó QS mechanizmus sérült. Az előkezelések hatására jelentősen lecsökkent a biofilmképzési ráta is, ami megerősíti, hogy a sejtek letapadásában is fontos szerepet játszó QS működése korlátozott. A legjobban a fahéj és komponense által mutatott gátlások támasztják ezt alá, ahol egyenesen arányos csökkenést tapasztaltunk a vizsgált folyamatok között. Hasonló eredményekről számoltak be Burt és munkatársai (2014), ahol a karvakrol hatására igazolódott be a biofilmképzés gátlás és a QS folyamat gátlása közötti szoros összefüggés.



**38. ábra.** A *C. violaceum* 85 WT biofilmképzési rátája illóolajokkal és komponenseikkel való kezelést követően előkezelt mintáknál. Az oszlopok (fekete: illóolaj; szürke: komponens) a biofilmképzési rátát, míg a vonalak (fekete: illóolaj; szürke: komponens) a sejtszám változását jelzik. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.



**39. ábra.** A *C. violaceum* 85 WT pigmenttermelési rátája illóolajokkal és komponenseikkel való kezelést követően (sötétlila: illóolaj; világos lila: komponens). Az adatok az előkezelt (4 órás tapadás alatt QS-gátló koncentrációban levő illóolaj/komponens oldattal) minták eredményeit tartalmazzák. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek.

## 5.4 Illóolajok hatása élelmiszereken

### 5.4.1 Nyers csirkemelleken kialakuló *L. monocytogenes* biofilmek eltávolítása illóolajos páclevek alkalmazásával

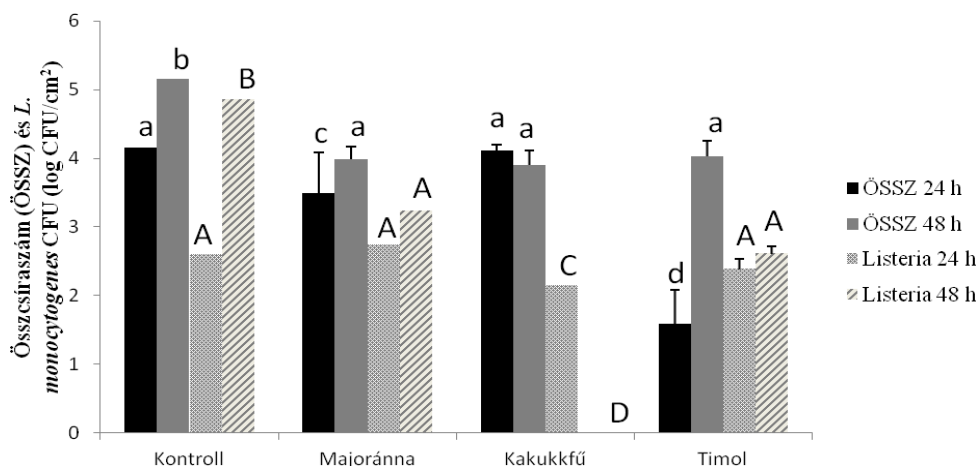
A frissen vásárolt csirkemell összes sejtszáma 4,3 log TKE/cm<sup>2</sup> volt, a coliformok száma kevesebb, mint 10 TKE/cm<sup>2</sup> és *Staphylococcus*, *Salmonella* és *Listeria* nem voltak jelen a mintákon. Ezek alapján a hús megfelelt az európai és magyarországi élelmiszerbiztonsági elvárásoknak. *Listeriával* történő fertőzést követő 24 órás előinkubáció után a nem mosott minták (NM) összes sejtszáma 3 log TKE/ cm<sup>2</sup> míg a mosott minták (MM) 3,45 log TKE/ cm<sup>2</sup> volt. A *Listeria* sejtszámok NM: 2,9 log TKE/ cm<sup>2</sup> és MM: 3,43 log TKE/ cm<sup>2</sup> voltak. Az *E. coli* sejtszáma továbbra is 10 log TKE/ cm<sup>2</sup> alatt maradt és *Staphylococcus* valamint *Salmonella* nem voltak jelen.

#### Nem mosott minták – hús felület

24 órás kezelést követően jelentős sejtszám csökkenést csak a timol esetében értünk el (2,5 log TKE/ cm<sup>2</sup>, P <0,001). A *Listeria* sejtszám szintén lecsökkent, de csak kakukkfűvel való kezelést követően (0,45 log TKE/cm<sup>2</sup>, P <0,001).

48 h után a NM kontroll minták összes sejtszáma 5,15 log TKE/ cm<sup>2</sup>-re emelkedett. A kezelt esetekben maradtak a 24 órás összes sejtszám értékek. A kontroll mintákban levő *Listeria* sejtszám (4,8 log TKE/ cm<sup>2</sup>) 1,6 log-al csökkent a majoránnával kezelt és 2 log-al a timollal kezelt mintákban. A kakukkfű illóolajjal *Listeria* sejtszám nem volt kimutatható, teljes gátlás következett be (40. ábra).

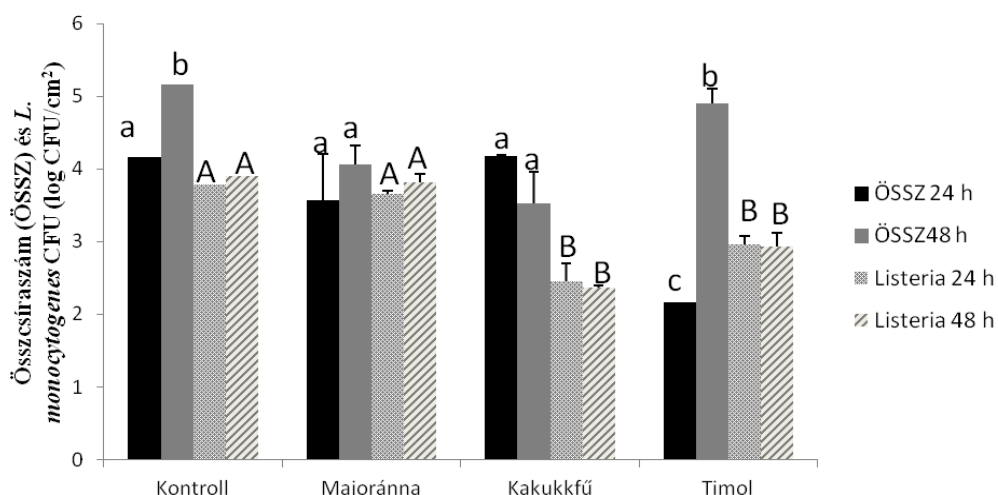




**40. ábra.** Nem mosott minták összes csíra- és *Listeria* sejtszáma illóolajos pácolást követően. A kisbetűs jelölések a kontroll és az illóolajjal kezelt minták közti eltéréseket mutatják összes sejtszám esetében, míg a nagy betűk a *Listeria* sejtszámok közötti eltéréseket.

#### Mosott minták – hús felülete

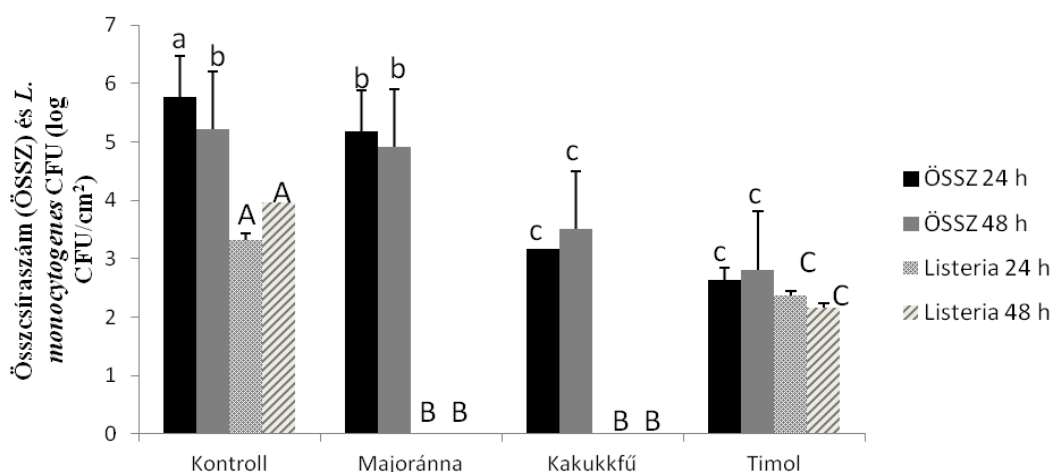
Ezen minták esetében a legjobb gátlószernak a timol bizonyult, 2 nagyságrenddel csökkentette az összes sejtszámot 24 órát követően. A *Listeria* TKE 1 nagyságrenddel csökkent kakukkfűves és timolos pácolást követően ( $P < 0.001$ ). 48 órás pácolás után a kontroll minták sejtszáma 5,15 log-ról 4 és 3,5 log-ra csökkent ( $P < 0.05$ ). Ebben az esetben a timol nem volt hatékony, de jó *Listeria*-ellenes hatás fejtett ki a kakukkfűvel együtt ( $P < 0.05$ ) (41. ábra).



**41. ábra.** Mosott minták összes csíra- és *Listeria* sejtszáma illóolajos pácolást követően. A kisbetűs jelölések a kontroll és az illóolajjal kezelt minták közti eltéréseket mutatják összes sejtszám esetében, míg a nagy betűk a *Listeria* sejtszámok közötti eltéréseket.

### Nem mosott minták-páclevei

Eredményeinket 42. ábra szemlélteti. Mindegyik kezelés csökkentette az összes sejtszámot a kontroll mintákhoz képest (5,76 log TKE/ cm<sup>2</sup>). A majoránna 0,6 log (P <0,05), a kakukkfű 2,5 log (P =0.003) és a timol 3 log (P <0.001) csökkenést eredményezett. A timol 2 nagyságrenddel csökkentette a *Listeria* sejtszámot, míg a másik két illóolajjal teljes gátlást értünk el. 48 órát követően a majoránna nem csökkentette az összes sejtszámot; ezzel ellentétben a kakukkfű és timol szignifikánsan gátolt 1,7 és 2 log csökkenést eredményezve. A majoránnás és kakukkfűes páclé esetében sem tudtuk kimutatni a *Listeria*-t; a timol 2 log sejtszám csökkenést eredményezett ebben az esetben.



**42. ábra.** Nem mosott minták páclévének összes csíra- és *Listeria* sejtszáma illóolajos pácolást követően. A kisbetűs jelölések a kontroll és az illóolajjal kezelt minták közti eltéréseket mutatják összes csíraszám esetében, míg a nagy betűk a *Listeria* sejtszámok közötti eltéréseket.

### Mosott minták- páclevei

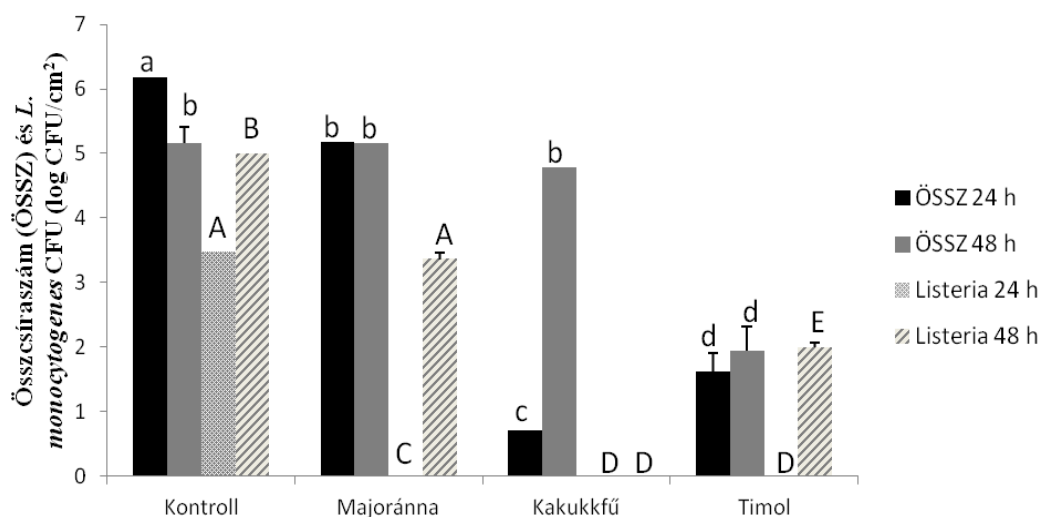
24 óra után a majoránna 1 log, a kakukkfű 6 és a timol 5 log összes sejtszám csökkenést eredményezett. A *Listeria* nem volt kimutatható egyik pácléből sem.

Csak a timol bizonyult hatékony gátlószernek 48 óra utáni pácolásnál az összes sejtszámok esetében (3 log csökkenés). A *Listeria* sejtszám mindegyik esetben lecsökkent, és a kakukkfű bizonyult a leghatékonyabbnak (43. ábra).

A mosással történő előkezelés nem befolyásolta az összes sejtszámokat. Ezzel ellentétben a mosott mintáknál a *Listeria* sejtszám megnőtt a 24 órás előinkubációt követően.

Feltételeztük, hogy egy lehetséges antagonista eltávolítása következhetett be mosás során. A szakirodalomban több helyen is említésre kerülnek a *Lactobacillusok*, amelyek jelen vannak a húsok felületén és a *Listeria* antagonistái (Farber és Peterkin 1991, Sakaridis et al. 2012).

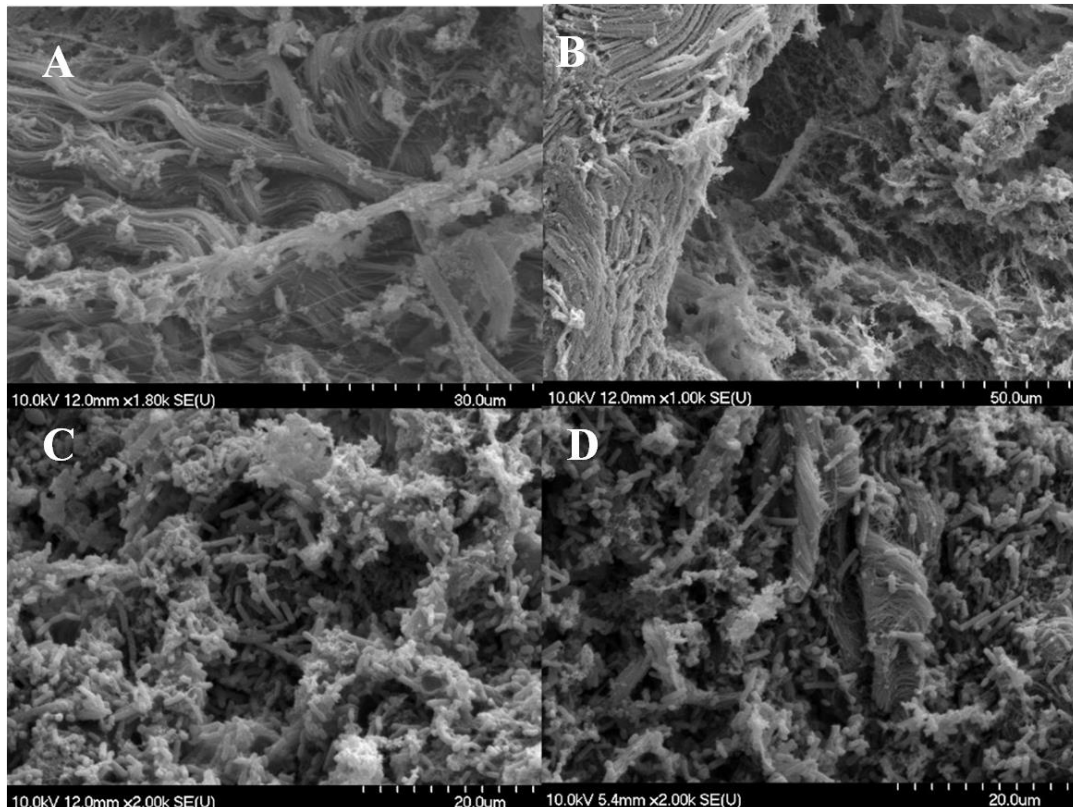
A páclevekben sokkal magasabb volt az összes sejtszám, mint a húsok felületén. Ezt befolyásolhatta a páclé hozzáadása, amely lemoshatta a hús felületéről a tápanyagokat így egy tápanyagokban gazdag környezet alakulhatott ki. Fontos kiemelni, hogy a kakukkfű és komponense hatékonyabban gátoltak a páclében, mint a felületeken. Ez az eredmény megegyezik az irodalomban leírtakkal, ahol kiemelik, hogy a szabadon úszó sejtek érzékenyebben a gátlószerekre (Hyldgaard et al. 2012). A kakukkfűvet Rimini és munkatársai (2014) is kipróbálták csirkemellen, ahol az olaj jelentősen lecsökkentette a lipidoxidációt és nem volt negatív hatással a hús külső megjelenésére, minőségére. Karabagias és munkatársai (2011) sikeresen növelték nyers bárányhús eltarthatóságát kakukkfű illóolajjal, azonban az érzékszervi vizsgálatok szerint az olaj negatívan befolyásolta a terméket. A szegfűszeg és fahéj illóolajok hatását vizsgálta Hoque et al. (2008) *L. monocytogenes* fertőzött darált csirkehús esetében és a fahéjjal ellentétben, a szegfűszeg rendkívül jó antimikrobiális hatást mutatott ebben a rendszerben.



**43. ábra.** Mosott minták páclevének összes csíra- és *Listeria* sejtszáma illóolajos pácolást követően. A kisbetűs jelölések a kontroll és az illóolajjal kezelt minták közti eltéréseket mutatják összes csíraszám esetében, míg a nagy betűk a *Listeria* sejtszámok közötti eltéréseket.

#### 5.4.2 Nyers csirkemellek felületéről készített elektronmikroszkópos (SEM) felvételek

Az 44. ábrán mosott és nem mosott, illóolajjal nem kezelt csirkemell minták SEM felvétele látható. A 24 órás MM és NM mintákon (43. ábra A és B) nem tapasztaltuk mikrobák jelenlétét a húsok felületén. A 48 órás mintákon már egyértelműen kivehetőek a sejtek, amelyek inkább a hús zsírszövetéhez tapadnak, mint a kötőszövetekhez. Ugyanakkor a rostok mélyedéseiben is jelen vannak, ahol mikrokolóniák kialakulása észlelhető.

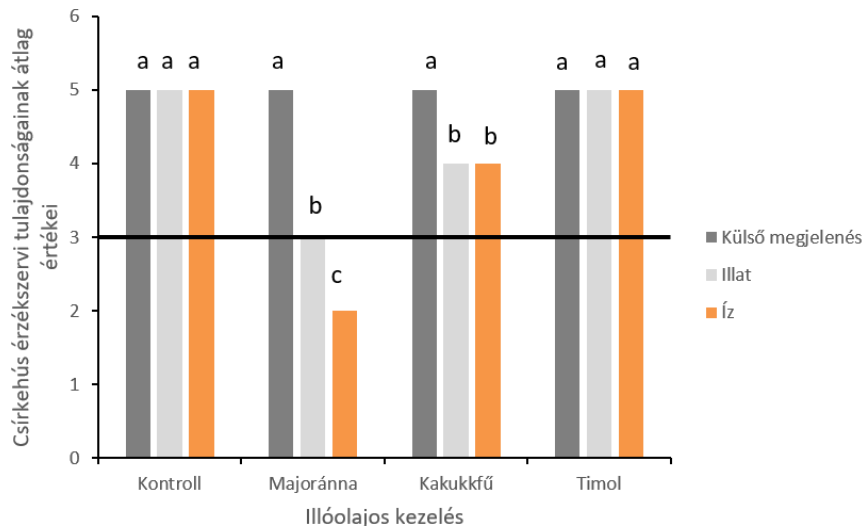


**44. ábra.** *L. monocytogenes* humán patogén baktériummal fertőzött nyers csirkehús SEM felvétele. A patogénnel való fertőzést követően a mintákat 24 órán keresztül hűtőben tároltuk (4-6 °C) A: 24 órás mosott minta; B: 24 órás nem mosott minta; C: 48 órás mosott minta; D: 48 órás nem mosott minta.

#### Érzékszervi vizsgálatok

A majoránnával pácolt húsok esetében a bírálók átlagolt pontszáma 3,4 volt az illat és 2,0 az íz esetében. Ezek az eredmények jelentősen eltérnek a kontroll csoport értékeitől, ahol az íz 4,3 és az illat 4,6 értékeléseket kapott. A bírálók fontosnak tartották kiemelni, hogy a húsnak kellemetlen utóíze volt. A kakukkfűvel és timóllal pácolt minták íze és illata

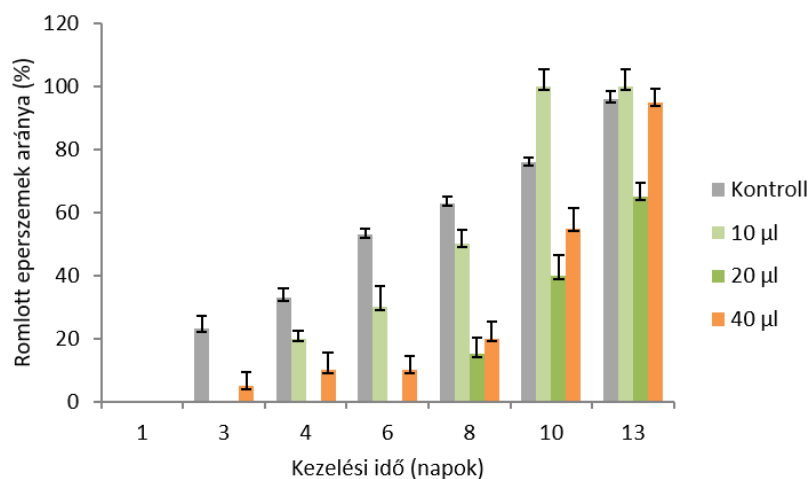
megegyezett a kontroll csoportéval. Ebben az esetben a bírálók kellemes, fűszeres ízt tulajdonítottak a mintáknak, amely harmonizált a hús íz világával. A külső megjelenésben nem tapasztaltunk eltérést egyik minta esetében sem (45. ábra).



**45. ábra.** Pácolt csirkemellek érzékszervi bírálatának átlag értékei. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek. Az elfogadhatósági határt a fekete vonal jelzi.

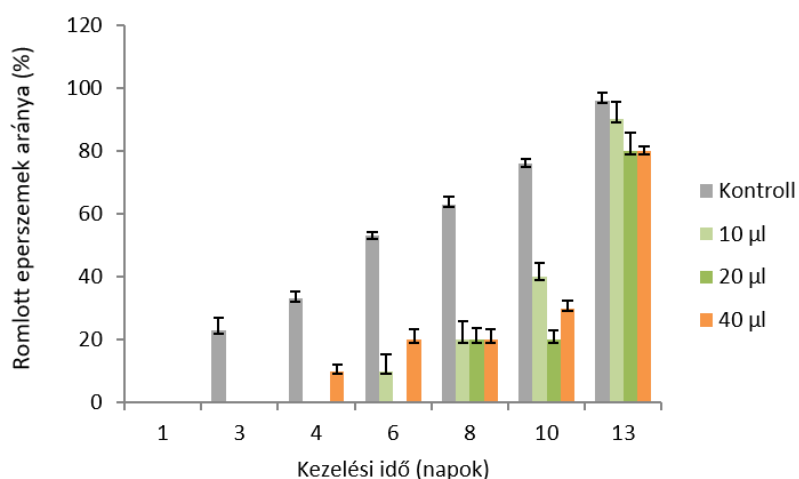
#### 5.4.3 Friss földieper eltarthatóságának növelése illóolajos gőztér segítségével

Eredményeinkből látható, hogy a citrom illóolajos gőztér növelte az eprek eltarthatóságot. A kontroll csoportban folyamatosan nőtt a penészes eperszemek száma, míg az illóolajos kezelésnél 1-2 nappal később jelentkezett a romlás. A legjobb eredményt a 40 µl/l koncentrációnál kaptuk, ahol még az utolsó napon is maradtak ép szemek (46. ábra).



**46. ábra.** A citromolaj által kialakított gőztér hatása eperek eltarthatósági idejére. Az ábrán a romlott eperszemek aránya látható a kezelési idő függvényében.

Azon citrom illóolajjal kezelt minták esetében, ahol 24 óra után eltávolítottuk az illóolajos korongokat hasonlóan jó eredményt értünk el, mint a korongos mintáknál. Csak a 8. naptól volt számottevő romlás, és a vizsgálat utolsó napján is voltak még penészmentes szemek (47. ábra). Vu és munkatársai (2011) a limonén (citrom illóolaj fő komponense) hatását vizsgálták eperek eltarthatóságára. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, a 12-dik napon is találtak még penészmentes szemeket.

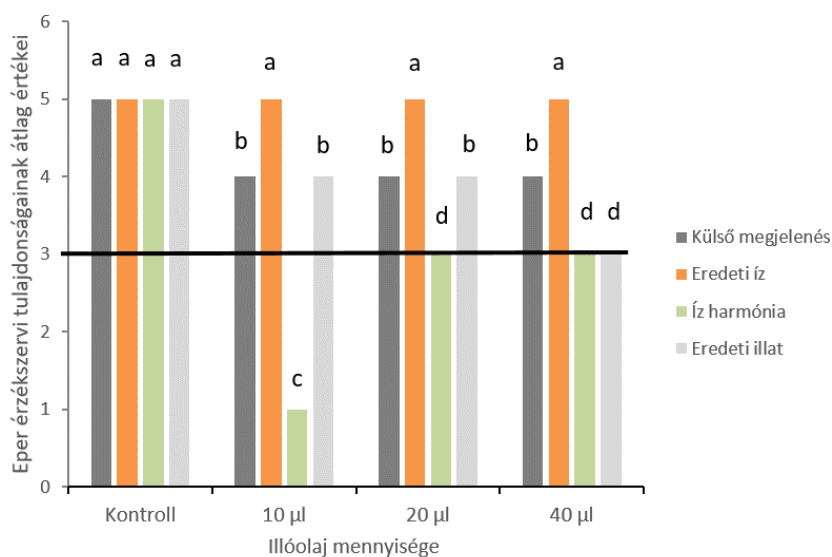


**47. ábra.** A 24 óra után eltávolított citromolajos korong által kialakított gőztér hatása eperek eltarthatósági idejére. Az ábrán a romlott eperszemek aránya látható a kezelési idő függvényében.

### Érzékszervi vizsgálatok

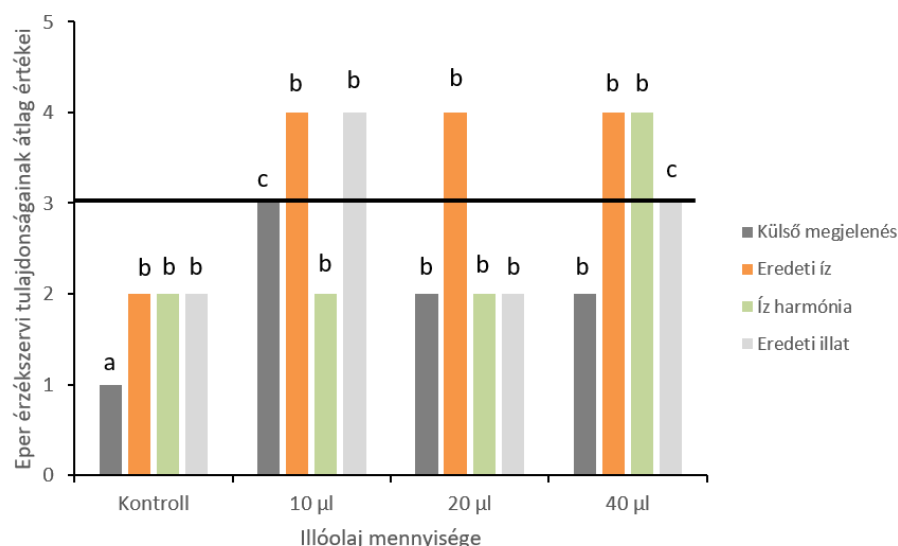
A vizsgálatokhoz azokat a gyümölcsöket használtuk fel, ahonnan egy nap után eltávolítottuk az illóolajjal átitatott papírkorongot.

A bírálók véleménye alapján az eprek minden esetben megtartották eredeti ízüket és illatukat is, ezek az értékek az elfogadhatósági határon belül voltak. A külső megjelenés egy értékkel alacsonyabbat kapott a kontroll mintáknál, azonban a bírálók nem jelezték pontos kifogásukat megjegyzés formájában (48. ábra).



**48. ábra.** Egy napos kezelt eper érzékszervi bírálatának átlag értékei. A különböző betűk a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelentenek. Az elfogadhatósági határt a fekete vonal jelzi.

A 7. napon a kontroll mintákban minden vizsgált jellemző az elfogadhatósági határ alatt volt, epreink már túlértek és penészedtek. Az illóolajjal kezelt eprek megőrizték a termékre jellemző külsejüket és eredeti ízüket. A 10 µl-el kezelt minták eredeti illata is magas pontszámot kapott, nagyobb mennyiségű olaj azonban negatívan befolyásolta ezt a paramétert. Összességében a citromolaj frissessége és illata, valamint üde íze miatt elég jól harmonizált az eperrel, mind illatban, mind ízben (49. ábra).

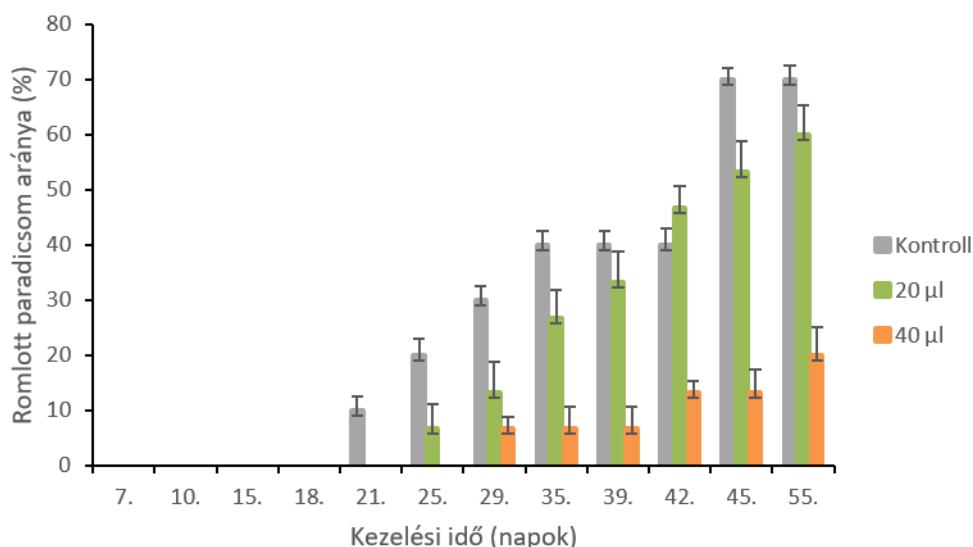


**49. ábra.** Illóolajjal kezelt epek érzékszervi bírálatának átlag értékei a 7. napon. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek. Az elfogadhatósági határt a fekete vonal jelzi.

#### 5.4.4 Koktélpáradicsom eltarthatóságának növelése illóolajos gőztér segítségével

A kontroll minták edényeiben az ötvenöt napból a huszonegyedik napon volt megfigyelhető az első penésztelep megjelenése. Ahol 20 µl/l kakukkfű illóolajat használtunk, a kontrollhoz képest 4 nappal később jelentkeztek a romlás jelei. A 40 µl/l-el tartósított koktélpáradicsomok esetében a 29. napon (kontrollhoz képest 8 nappal később) jelentkezett a fertőzés. A kísérlet végére (55. nap) a 20 µl/l koncentráció mellett 60%-os míg 40 µl/l esetében csak 20%-os volt a fertőzöttség a kontroll mintákhoz képest (50. ábra). Oregánó illóolajat használva Yun és munkatársai kimutatták, hogy a hatékony antimikrobiális hatás mellett az olaj hatására a páradicsomok minősége jobb, mint a kontroll mintáké.

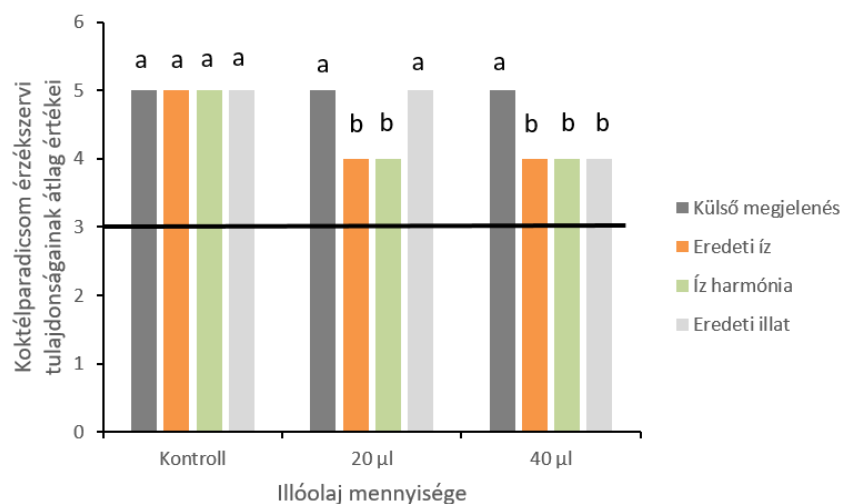




**50. ábra.** A kakukkfű illóolaj által kialakított gőztér hatása koktélpáradicsomok eltarthatósági idejére. Az ábrán a romlott páradicsomok aránya látható a kezelési idő függvényében.

#### Érzékszervi vizsgálatok

A 20 µl/l-es kakukkfű olajjal kezelt koktélpáradicsomok külsején elváltozás nem volt tapasztalható és illata a termékre jellemző volt. Kettévágva is a terméknek megfelelő illat, külső megjelenés volt tapasztalható. Ízüket tekintve, a jellegzetes páradicsom íze mellett, enyhén fűszeres aromát tapasztaltunk, amelyet inkább kellemesnek ítélte a bizottság. A 40 µl/l-es kakukkfű olajjal kezelt koktélpáradicsomok külsején, belső részeken, illatában sem volt fellelhető elváltozás. Ami az ízvilágot illeti enyhe eltérést tapasztaltunk a páradicsomok héjában, ahol egy édeskés, de nem a rá jellemző íz volt tapasztalható. A húsan jellegzetes, nem a termékre jellemző intenzívebb fűszeres aromát éreztünk, amely ebben az esetben sem volt kellemetlen (51. ábra).



**51. ábra.** Koktélpáradicsomok érzékszervi bírálatának átlag értékei. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek. Az elfogadhatósági határt a fekete vonal jelzi.

#### 5.4.5 Gyümölcslevek eltarthatóságának növelése illóolajok segítségével

##### MIC értékek meghatározása tápoldatban és 100%-os szőlőlében

A szőlőlé tápanyag- és cukortartalma sokkal magasabb, mint a tápoldaté, ezért ez a közeg jobban kedvezett az élesztőgombák túlélésének az illóolajok hatásával szemben. Következésképpen magasabb MIC értékeket figyelhetünk meg a vizsgálat kiértékelésénél. Tserennadmid (2010) és munkatársai kutatásainak eredményei ezekhez hasonlóak. Ezekben a vizsgálatokban szűrt és szűretlen almalében, valamint tápoldatban vizsgálták citromolaj hatását élesztőgombákra. Ezekben a kísérletekben, a tápoldatban megfigyelt MIC értékek alacsonyabbak, az almalében kapott értékeknél. A malátás tápoldatban a citromolaj hatásosabb volt az élesztőgombák ellen, s a hőkezelés láthatóan ezt a hatást erősítette. Míg szobahőmérsékleten a MIC érték 0,25 mg/ml volt, addig az 55°C-os hőkezelés hatására ez az érték 0,125 mg/ml-re csökkent. Tehát a citromolaj esetében arra lehet következtetni, hogy a hőkezelés erősítheti az antiszeptikus hatást, de ezt a szőlőlével végzett kísérletek nem erősítették meg (17. táblázat).

17. táblázat. A citrom illóolaj MIC értékei malátás tápoldatban illetve 100%-os szőlőlében (mg/ml).

| <b>Malátás tápoldat<br/>(25 °C)</b> | <b>100% szőlőlé<br/>(25 °C)</b> | <b>Malátás tápoldat<br/>(55 °C)</b> | <b>100% szőlőlé<br/>(55 °C)</b> |
|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 0,25                                | 0,5                             | 0,125                               | 0,5                             |

A fahéj esetében az előző vizsgálat eredményeivel eltérő eredményeket kaptunk. A szőlőlével végzett vizsgálatok során a MIC értékek alacsonyabbak, mint a malátás táptalajjal végzett kísérletek esetében. Míg a malátás táptalajban a MIC érték 0,5 mg/ml lett, addig a szőlőleves vizsgálatok során alacsonyabb MIC értéket mutattak (0,125 mg/ml). A kísérletek során a hőkezelés minden esetben megnövelte az illóolajok hatékonyságát (18. táblázat).

18. táblázat. A fahéj illóolaj MIC értékei malátás tápoldatban illetve 100%-os szőlőlében (mg/ml).

| <b>Malátás tápoldat<br/>(25 °C)</b> | <b>100% Szőlőlé<br/>(25 °C)</b> | <b>Malátás tápoldat<br/>(55 °C)</b> | <b>100% Szőlőlé<br/>(55 °C)</b> |
|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 0,5                                 | 0,125                           | 0,25                                | 0,0625                          |

A fahéj illóolajjal végzett kísérleteknél tehát világosan látszik, hogy már az enyhe hőkezelés is előnyösen befolyásolja az illóolajok antiszeptikus hatását. Inouye és munkatársai (2007) vizsgálataiban a fahéjolaj minimális fungicid koncentráció (MFC) értékét keresték a *Trichophyton mentagrophytes* ellen 25 °C és 42 °C-on. A hőkezelt mintákban az MFC érték szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a 25 °C-on vizsgált mintákban. Az összes többi vizsgált illóolajjal is hasonló eredmények születtek.

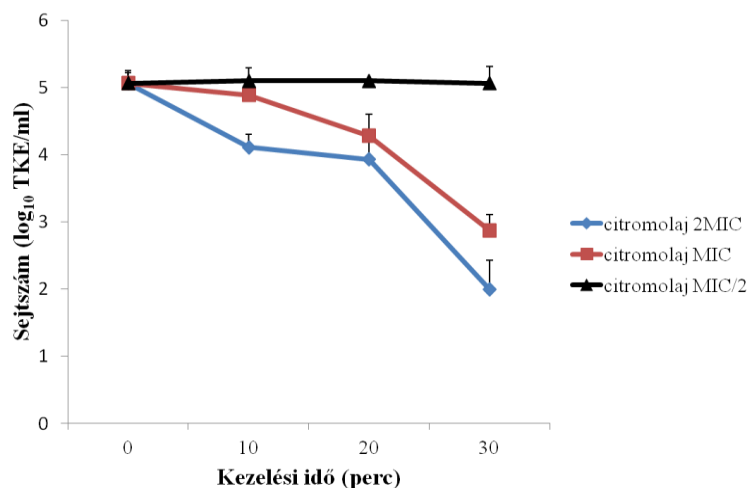
#### S. cerevisiae túlélése 100%-os szőlőlében

A hőkezelt illetve illóolajokkal kezelt szőlőlevelek eredményeit az 19. táblázat tartalmazza. Ezekben az esetekben a kezelt minták nem tértek el a kezeletlenektől, tehát önmagában a hőkezelés és az illóolajos kezelés nem bizonyult hatásosnak.

19. táblázat. Az *S. cerevisiae* sejtszámai ( $\log_{10}$  TKE/ml) 100%-os szőlőlében hőkezelést és illóolajos kezeléseket követően.

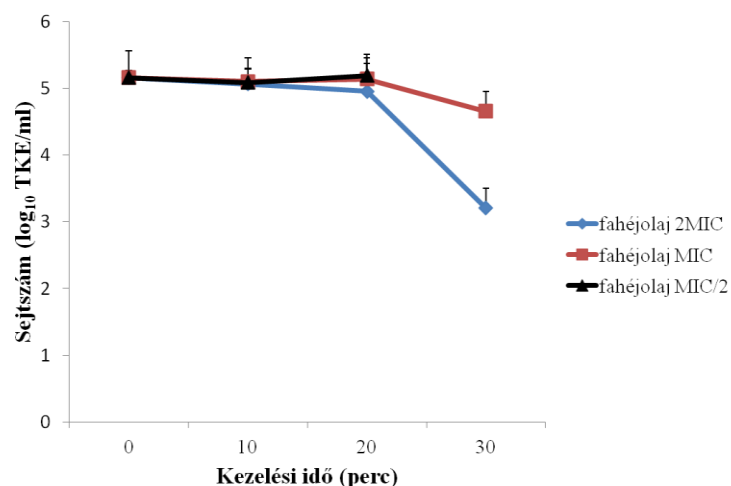
| Kezelés időtartama (perc) | Hőkezelés | Citrom illóolaj | Fahéj illóolaj |
|---------------------------|-----------|-----------------|----------------|
| 0 (Kontroll)              | 5,15±0,05 | 5,65±0,03       | 5,45±0,04      |
| 10                        | 5,17±0,05 | 5,82±0,02       | 5,32±0,04      |
| 20                        | 5,03±0,02 | 5,54±0,01       | 5,18±0,05      |
| 30                        | 5,10±0,03 | 5,59±0,05       | 5,50±0,05      |

A hőkezelést illóolaj hozzáadásával kombinálva a citrom a MIC/2 koncentráció kivételével mindenhol jelentős csíraölő hatást tapasztalunk (52. ábra).



52. ábra. Hőkezeléssel kombinált citrom illóolaj hatása az *S. cerevisiae* túlélésére 100%-os szőlőlében.

A fahéjolaj és hőkezelés kombinálása esetében csak a 2 MIC koncentrációnál figyelhető meg jelentősebb csíraszám-csökkenés. A MIC koncentrációnál csak 30 perc után kezdett el csökkenni a sejtszám, a MIC/2 koncentráció esetében egyáltalán nem figyelhető meg csökkenés (53. ábra).



**53. ábra.** Hőkezeléssel kombinált fahéj illóolaj hatása az *S. cerevisiae* túlélésére 100%-os szőlőlében.

#### Illóolajok és hőkezelés hatása natúr szőlőlevelek eltarthatóságára

Az illóolajok és a hőkezelés kombinálásával a tárolástól függetlenül a natúr szőlőlé több mint két hétig változatlan állapotú volt, nem volt megfigyelhető romlás. Ez bizonyult tehát a leghatásosabb kezelési módszernek. A forralás hatására a szőlőlé 10 napig maradt friss. Egyéb módon kezelt, vagy kezeletlen szőlőlevelek egy héten belül romlásnak indultak (20. táblázat).

Az irodalomban fellelhető hasonló megfigyelés, például Espina és munkatársai (2011) kimutatták, hogy ha a citrom, narancs és mandarin illóolajokhoz (0,2 µl/ml) hőkezelést is társítottak (54 °C/10 perc), szinergista hatás volt kimutatható és jelentősen több *E. coli* és *L. monocytogenes* sejt pusztult el, mint ha a két kezelést külön alkalmazták volna.

20. táblázat. Natúr szőlőlé eltarthatósági idejének növelése különböző kezelési és tárolási eljárásokkal. A napok száma a szemmel látható romlásig eltelt időt mutatja.

| Szobahőmérsékleten tárolt minták |                  |       |        |       |        |
|----------------------------------|------------------|-------|--------|-------|--------|
| Kontroll                         | Szobahőmérséklet |       | 55 °C  |       | 100 °C |
|                                  | Citrom           | Fahéj | Citrom | Fahéj |        |
| 7                                | 7                | 7     | 16     | 30    | 10     |
| Hűtve tárolt minták              |                  |       |        |       |        |
| Kontroll                         | Szobahőmérséklet |       | 55 °C  |       | 100 °C |
|                                  | Citrom           | Fahéj | Citrom | Fahéj |        |
| 3                                | 6                | 6     | 36     | 36    | 10     |

A kezelési alternatívák sorrendje: 55°C + illóolaj > 100 °C > illóolaj > kezeletlen. A sorrend mindkét tárolási módszer esetén hasonló, viszont ha összehasonlítjuk az egyes kezelési és tárolási módszerek kombinációit, megfigyelhetjük, hogy az 55 °C-os és illóolajos kezelés esetén a hűtve tárolás a kedvezőbb.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fertőzött élelmiszerek nagy gondot jelentenek az ipar és egészségügy számára, az anyagi veszteségek mellett a súlyos, akut megbetegedések nagy százalékaért az ételmérgezések felelősek.

Az eltarthatóságot növelő tényezők esetében a régóta alkalmazott mechanikai és kémiai eljárások mellett nyitni kell az újabb technológiák és módszerek felé, ugyanis az eltarthatóságot csökkentő mikrobák egyre rezisztensebbek a megszokott módszerekkel szemben. Emellett a hagyományos tartósítószeres nem csak a fogyasztók ellenérzését váltják ki, de sokszor kellemetlen melléktermékek is keletkezhetnek a használatuk során.

Jelen dolgozat célja volt megvizsgálni néhány, előkísérletekben kiválasztott illóolaj és fő összetevő antimikrobiális, anti-biofilmképző és anti-QS hatását élelmiszerromlást okozó és patogén mikroorganizmusok esetében. A QS mechanizmus tanulmányozása során bioszenzor törzsek segítségével kimutattuk a folyamatot szabályozó jelmolekulák jelenlétét környezeti izolátumokból illetve megállapítottuk illóolajaink és fő összetevőik anti-QS hatását. Továbbá összefüggéseket kerestünk a biofilmképzés és a QS mechanizmus által szabályozott pigmenttermelés között. Kísérleteink kitértek az illóolajok élelmiszerekben kifejtett hatására is, különös figyelmet fordítva a termékek eredeti ízére, illatára, fogyaszthatóságára.

Ezen célkitűzések alapján elvégzett vizsgálatok eredményei a következők:

### 1. A tesztelt illóolajok és komponensek mindegyike rendelkezett jó antimikrobiális és biofilmképzést gátló hatással.

28 tiszta tenyészetet izoláltunk környezeti mintákból és ebből 27 esetében végeztük el a fajszintű meghatározását. A laboratóriumi törzsek mellett az illóolajok és komponenseik hatása tesztelésre került a húsokról izolált *Pantoea agglomerans* opportunistá patogén és a húsook romlását okozó *Kurthia gibbsonii* törzsek esetében is.

A mikroorganizmusok egyéni érzékenységét figyelembe véve általánosságban elmondható, hogy a laboratóriumi törzsek és környezeti izolátumok esetében a fahéj (aromás fő összetevő) és kakukkfű (fenolos fő összetevő) mutattak alacsony MIC értékeket. A citrom és boróka gyengébb antimikrobiális hatást mutattak. A megváltozott összetételű majoránna (terpén alkoholok, monoterpének) és kakukkfű (fenolos, aromás gyűrű) esetében általában megnőtt a gátló koncentrációk értéke. Feltételezhető, hogy mindkét esetben az új fő összetevő (p-cimén) alacsony antimikrobiális hatása miatt.

A biofilmképzést illetően a G-pozitív laboratóriumi baktériumoknál a leghatásosabb olaj és komponens a fahéj és fahéjaldehyd voltak, kevésbé hatásosnak pedig a citrom és a boróka bizonyultak. Élesztőgombáknál a limonén volt a leggyengébb fő összetevő. A élelmiszer eredetű izolátumokra a fahéj és összetevője voltak a leghatásosabbak, kevésbé gátolt a majoránna és a terpinén-4-ol. Kevert tenyészeteknél a *Listeria* + *E. coli* esetében a kontroll mintákban a *Listeria* hat nagyságrenddel túlnőtte az *E. coli*-t. Illóolajok hozzáadásával, gátlódott a *Listeria* szaporodása, a sejtszámbeli eltérés csökkenni kezdett. A *Listeria* + *Staphylococcus* kevert közösség esetében a két baktérium erős biofilmeket képezett, csak magas koncentrációjú olajok gátolták képződésüket. A megváltozott összetétel következtében a majoránna és kakukkfű illóolajok mindegyik esetben gyengébb anti-biofilm hatást mutattak.

Pásztázó elektronmikroszkópos felvételekkel igazoltuk a vizsgált illóolajok sejtfalat roncsoló hatását egyfajos és kevert biofilmek képzése esetében.

## **2. Kimutattuk QS jelmolekulák jelenlétét élelmiszerekről izolált törzsek esetében. Az illóolajok és fő komponenseik hatékony QS-gátlóknak bizonyultak.**

Hosszú szénláncú AHL jelmolekulákat mutattunk ki csirkemellről, paprikáról, retekről és csomagolt salátáról izolált törzsek esetében, míg a kacsamellekről és egy, csírakeverékről izolált törzseknél inkább rövid szénláncú jelmolekulákat detektáltunk. Méréseink során az izolátumok egyike esetében sem tudtuk kimutatni az AI-2 jelenlétét. A laboratóriumi törzsek közül csak a *P. anomala* felülúszója mutatott a pozitív AI-2 kontrollhoz hasonló mintázatot.

A papírkorong diffúziós módszerrel a citrom és fő komponense kivételével mindegyik hatóanyag gátolta a *C. violaceum* QS rendszerét. Ezzel ellentétben a *S. marcescens* esetében csak a fahéj és muskotályzsálya gátolták a folyamatot. Folyadéktenyészetekhez hozzáadva, mindegyik olaj pigmenttermelést csökkentő hatása tapasztalható volt alacsony koncentrációkban (µg/ml) is.

Összefüggést találtunk a biofilmképzés és QS gátlás között, ugyanis a kezelések csökkentették a *C. violaceum* pigmenttermelési rátáját és biofilmképzését is. A QS befolyásolhatta a biofilmeket kialakító sejtek letapadását is, ezt legjobban a fahéj és komponense által okozott változások támasztják alá.

## **3. Sikerült gátolni a *L. monocytogenes* biofilmek kialakulását csirkehuson. Növeltük a földieper, koktélpáradicsom és szőlőlé eltarthatóságát illóolajok hozzáadásával.**



Illóolajos pácolást követően, a kakukkfű és timol gátolták a *L. monocytogenes* biofilmek kialakulását a húsok felületén. A kakukkfűvel és timollal pácolt mintáknál kellemes, fűszeres ízt tapasztaltunk, amely harmonizált a hús íz világával.

A citrom illóolajos gőztér növelte az eprek eltarthatóságot, 1-2 nappal később jelentkezett a romlás a kontroll mintákhoz képest.

Koktélpáradicsomok esetében a kontrollhoz képest 4-8 nappal később jelentkeztek a fertőzés. Ízüket tekintve, a jellegzetes íz mellett, enyhén fűszeres aromát tapasztaltunk, amelyet kellemesnek ítélték az érzékszervi bírálók.

A citrom illóolaj esetében magasabb, míg a fahéjnal alacsonyabb MIC értékeket figyelhetünk meg 100% szőlőlevelekben, mint malátás tápoldatban. Az enyhe hőkezelés minden esetben megnövelte az illóolajok hatékonyságát.

A kutatási program eredményeként új információkkal bővültek ismereteink az illóolajok antimikrobiális, anti-biofilmképző és anti-QS hatásairól. Ezek mellett tudomást szereztünk élelmiszerekben kifejtett tartósító hatásaikról is. Munkánk során hat illóolajat és ezek fő komponenseit vizsgáltuk, mint potenciális élelmiszertartósítót kilenc, élelmiszerromlást okozó típustörzs és két élelmiszerekről izolált mikroba életfolyamataira kifejtett hatásuk által. A rezisztens biofilmek kialakulását befolyásoló sejt-sejt kommunikáció megzavarásával kimutattuk ezen illóolajok hatásának sokoldalúságát és új védekezési lehetőségeket tártunk fel a biztonságos élelmiszerekért zajló harcban. Élelmiszereken kifejtett hatásuk esetében sikerült olyan koncentrációkat találni, amelyek antimikrobiális hatásuk mellett kellemes, fűszeres ízt kölcsönöznek a termékeknek. Eredményeink alapján a tesztelt illóolajok alkalmazhatóak a biofilmképzés és sejt-sejt kommunikáció folyamatainak gátlására valamint nyers csirke hús, koktélpáradicsom, eper és szőlőlevelek eltarthatósági idejének növelésére is. Tudomásunk szerint elsőként teszteltük ezen hat illóolaj *P. anomala* biofilmképzésére kifejtett hatását, anti-QS aktivitását a *S. marcescens* pigmenttermelésére úgy szilárd, mint folyadéktenyészetekben, valamint elsőként alkalmaztuk a majoránna illóolajat nyers csirkehús pácolására.

## 7. SUMMARY

High quality and safe foods are one of the cornerstones of our society. Food manufacturers need to keep up to date, to be in terms of production technologies and compliance with food safety rules. Contaminated foods pose a major concern for health and food poisoning is responsible for several acute diseases.

For extending shelf-life the manufacturers should be open-minded and besides mechanical and chemical methods the development of new strategies is needed. In addition to conventional preservatives they do not only trigger consumer aversion, but often unpleasant by-products can arise. Many investigations have been made in order to be able to at least partially replace chemically synthesized preservatives with natural materials.

It must be taken into consideration that most of the microorganisms can form biofilms. There is also communication between the biofilm forming bacteria, this mechanism is called *quorum sensing* (QS). This process regulates cell adhesion and the development of microcolonies. Detailed mapping and understanding of these mechanisms may be the key to more effective food preservation processes.

Essential oils are aromatic hydrophobic liquids originated from plant material. They can be obtained by steam distillation or extraction. Most of them have GRAS (generally considered to be safe) and FA (food additives) status thus can be used safely in foods.

The present study aimed to examine the effect of essential oils on the biofilm formation of food spoilage and pathogenic microorganisms. Mono- and mixed communities were also studied. Essential oils have a lot of components, and in many cases the main antimicrobial effect is owned to the major component. Therefore we investigated the effect of major components as well on these processes.

Knowledge of the mode of action of essential oils is the key to successful development of disinfection procedures and increasing shelf-life. We examined the effect of essential oil and major components for mono-, and mixed biofilm communities using electron microscopy. Regarding QS we used biosensor strains to determine the anti-QS effect of our essential oil and the main components. Also, we looked for correlations between pigment production controlled by QS and biofilm formation. The production of signal molecules by isolates from food was also investigated. We tested the effect of essential oils in real foods as well, with particular attention to original taste, odour and edibility of the products.

The results of the assays performed by the objectives are as follows:

## **1. All essential oils and components had good antimicrobial and anti-biofilm forming effect.**

At the beginning of our experiments we isolated 28 pure cultures from the food samples and 27 were subjected to sequencing. Besides laboratory strains the effect of EOs and components was also tested in case of two isolates: the opportunistic pathogen *P. agglomerans* and the meat-spoiler *K. gibbsonii*.

In case of laboratory strains and isolates cinnamon (aromatic major component) and thyme (phenolic major component) EOs and their main components had the lowest MIC values. For yeasts these values were lower than 1 mg/ml. Lemon and juniper EOs contained monoterpenes as major components and this could be the reason for their lower antimicrobial effect. The composition of marjoram and thyme changed after a stock update in 2015. In both cases the major component changed to p- cymene and this resulted in higher MIC values for these oils.

In case of biofilm formation for G-positive bacteria the most effective oils were cinnamon and cinnamaldehyde, less effective was lemon and juniper. Environmental isolates were sensitive to cinnamon as well; marjoram and terpinene-4-ol had no significant effect. Yeasts were less susceptible to limonene.

In mixed-cultures of *Listeria* and *E. coli*, *Listeria* overgrew *E. coli* but after adding EOs to the culture, *Listerial* growth was inhibited and the difference in cell numbers was reduced. Mixed cultures of *Listeria* and *Staphylococcus* were more resistant; only high concentrations of EOs reduced their formation. The change in the composition of marjoram and thyme resulted in a less effective anti-biofilm forming effect.

We confirmed the destructive effect of EOs on the cell wall of bacteria in mono- and mixed culture biofilms with scanning electron microscopy. SEM images demonstrated the well known effect of EOs described in the literature. They exhibit antimicrobial effect by damaging the cell wall and cell membrane. Compared to the untreated samples where three dimensional, mature biofilms were visible, in the treated ones damaged cells, EPS without cells and small microcolonies were observed.

## **2. We demonstrated the presence of AHL signal molecules from bacterial isolates. EOs and components resulted to be good anti-QS agents.**

Long chain AHL signal molecules were produced by bacteria isolated from chicken meat, paprika, horse radish and packed salad. Short chain AHLs were detected from duck meat

and germ mixture. We could not detect AI-2 signal molecules from our isolates, only *P. anomala* laboratory strain showed signs of AI-2 production.

Using paperdisc diffusion assay we demonstrated that besides lemon all EOs and components had good anti-QS effect. In case of *S. marcescens* in most cases only growth was inhibited. The anti-QS effect of the oils was higher in liquid cultures in addition to a constant cell number even at low concentrations for both of the biosensor strains. This suggests that the oils interfere with the QS system.

We found a link between QS and biofilm formation; our treatments reduced both the pigment production and biofilm formation of *C. violaceum*. Also, it seems that QS plays an important role in the attachment of cells to surfaces, this is supported by results obtained with cinnamon EO.

### **3. With the aid of EOs we inhibited the formation of *L. monocytogenes* biofilms on chicken meat and increased the shelf-life of strawberries, cherry tomatoes and grape juice.**

After marinating with EOs, thyme and its major component thymol inhibited biofilm formation of *L. monocytogenes*; this inhibition was more successful in marinating solutions. Pretreatment with washing of the meat did not influence total germ counts. On the contrary, *Listerial* cell numbers grew in the pretreated samples after 24 hours. This could mean that an antagonist was present on the meat which was removed by washing. The taste and odour of samples marinated with thyme and thymol was similar to the control samples; the spicy taste harmonised with the flavour of the meat.

Strawberries treated with lemon vapour remained fresh 1-2 days longer than the untreated samples. The disc can be removed after 24 hours without decreasing the shelf-life elongation effect. The taste and odour of the fruits was not negatively influenced by the EO.

Using 20µl/l thyme EO we increased the shelf life of cherry tomatoes with 4 days, as for 40µl/l concentration this time was increased with 8 days. The taste and odour of the vegetables was spicy and pleasant.

We detected higher MIC values for lemon in grape juice than in MEA broth but these were lower in case of cinnamon. Mild heat treatment increased the effect of EOs in all cases.

As a result of the research program we expanded our knowledge about essential oils and their antimicrobial, anti-biofilm forming and anti-QS effect. In addition, we have become aware of their preserving effect on specific foods as well. We examined six EOs and their main components against the biofilm formation of nine laboratory strains that cause food spoilage and two strains isolated from foods. By disturbing cell-to-cell communication that influences the formation of resistant biofilms we showed the versatility of these essential oils and we presented new possibilities for the production of safe and healthy foods. We found concentrations with good antimicrobial effects and spicy, pleasant flavor to the products. Based on our results, the tested essential oils can be used for inhibition of biofilm formation and cell-cell communication processes. They can also increase the shelf life of raw chicken meat, cherry tomatoes, strawberries and grape juice. To our knowledge, this is the first study that tested the effect of these essential oils on *P. anomala* biofilm formation, on the QS of *S. marcescens* in solid as in liquid culture, and the preserving effect of marjoram essential oil by marinating of raw chicken meat.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

- Adonizio, A.L., Downum, K., Bennett, B.C., Mathee, K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J. Ethnopharmacol.* 105: 427-435.
- Adukwu, E. C., Allen, S. C. H., Phillips, C. A. (2012). The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 113 (5): 1217–1227.
- Ahmad, A., Viljoen, A. M., Chenia, H. Y. (2015). The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing. *Lett Appl Microbiol.* 60(1): 8–19.
- Ahmad, I., Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol* 74: 113- 123.
- Al-Adawi, A.S., Gaylarde, C.C., Sunner, J., Beech, I.B. (2016). Transfer of bacteria between stainless steel and chicken meat: A CLSM and DGGE study of biofilms. *AIMS Microbiol.* 2(3): 340-358.
- Amalaradjou, M. A. R., Narayanan, A., Baskaran, S. A., Venkitanarayanan, K. (2010). Antibiofilm effect of trans-cinnamaldehyde on uropathogenic *Escherichia coli*. *J Urol.* 184 (1): 358–363.
- An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., Parsek, M. R. (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *PNAS, USA*, 103 (10): 3828–3833.
- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., Kumar, V., Kaur, M. (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *Int J Food Sci.* 2014: 1-7.
- Angienda, P.O., Onyango, D.M., Hill, D.J. (2010). Potential application of plant essential oils at sub-lethal concentrations under extrinsic conditions that enhance their antimicrobial effectiveness against pathogenic bacteria. *J Microbiol.* 4 (16): 1678-1684.
- Atrea, I., Papavergou, A., Amvrosiadis, I., Savvaidis, I. N. (2009). Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. *Food Microbiol.* 26 (2): 166–172.
- Aydin, S., Basaran, A.A., Basaran, N. (2005). Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *J Agr Food Chem* 53: 1299–1305.
- Bai, A.J., Rai, V.R. (2011) Bacterial quorum sensing and food industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 10: 184–194.
- Bakkali, F., Averbeck, S, Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol.* 46: 446–475.
- Baráthné Simkó, H. (2014). Óshonos Thymus (kakukkfű) taxonok kémiai diverzitásának, valamint termesztési lehetőségének értékelése. Doktori értekezés, Budapest, p. 15-16.
- Bassler, B. L., Wright, M., Silverman, M. R. (1994). Sequence and function of *luxO*, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol.* 12: 403–412.
- Belletti, N., Kamdem, S.S., Tabanelli, G., Lanciotti, R. and Gardini, F. (2010). Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *Int. J. Food. Microbiol.* 136: 283–289.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J.A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., Ghigo, J.M. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol.* 51: 659–674.
- Bentley, R., Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol. Rev.* 46 (3): 241–80.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009). In: Volume 3: The Firmicutes, Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W. (szerk.), Springer
- Blana, V. A. (2010). Quorum Sensing: understanding the role of bacterial in meat spoilage, Doktori értekezés, p. 86.
- Bleasel, N. , Tate, B., Rademaker, M. (2002). Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. *Australas J Dermatol.* 43: 211-213.

- Breuer, Uta., Hauke, Harms. (2006). *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*. 23 (6): 415–437.
- Budzyńska, A., Sadowska, B., Lipowczan, G., Maciąg, A., Kalembe, D., Różalska, B. (2013). Activity of selected essential oils against *Candida* spp. strains. Evaluation of new aspects of their specific pharmacological properties, with special reference to lemon balm. *Adv Microbiol*. 3(4): 317–325.
- Budzyńska, A., Wieckowska-Szakiel, M., Sadowska, B., Kalembe, D., Różalska, B. (2011). Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol*. 60(1): 35–41.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol*. 94: 223– 253.
- Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T. A., Woertman, J., Veldhuizen, E. J. A. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS ONE*. 9(4), 1–6.
- Burt, S.A., van der Zee, R., Koets, A.P., de Graaff, A.M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J.A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 73: 4484–4490.
- Busatta, C., Vidal, R. S., Popiolski, A. S., Mossi, A. J., Dariva, C., Rodrigues, M. R. A., Corazza, F.C., Corazza, M.L., Oliveira, V.J., Cansian, R. L. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiol*, 25 (1): 207–211.
- Carpentier, B., Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in food industry. *J Appl Bacteriol*. 75: 499–511.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 11(11): 1119–1129.
- Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Itkin, M., Sacher, A., Sessa, G., Barash, I. (2008). Quorum-sensing system affects gall development incited by *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 21(8), 1094–1105.
- Characklis, W.G., McFeters, G.A., Marshall, K.C. (1990). Physiological ecology in biofilm systems. In: Characklis, W. G., Marshall, K.C. (szerk), *Biofilms*. John Wiley & Sons, New York, p. 341–94.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q.H., Clardy, J. F (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *PNAS*. 101(14): 5048-5042.
- Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Kourkoutas, Y., Nychas, G. J. E. (2010). Inhibition of the early stage of *Salmonella enterica* serovar enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture. *Appl Environ Microbiol*. 76 (6): 2018–2022.
- Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Skandamis, P. N., Haroutounian, S. A., Nychas, G. J. E. (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *J Appl Microbiol*. 104 (6): 1586–1596.
- Cos, P.; Vlietink, A.J.; Berghe, D.V.; Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* “proof of concept”. *J Ethnopharmacol*. 106: 290-302.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322.
- da Silva, P. M. B., Acosta, E. J. T. R., de Rezende Pinto, L., Graeff, M., Spolidorio, D. M. P., Almeida, R. S., Porto, V.C. (2011). Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses*. 54 (6): 712-717.
- Deák, T. (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*. Budapest: Mezőgazda Kiado, 382 p.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. (2010) Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathog*. 6 (7): e1000989.

- Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., Pongor, S., Venturi, V. (2002). Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: Cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Curr Microbiol.* 45(4): 250–254.
- Dierick, K., Coillie, E. Van, Swiecicka, I., Devlieger, H., Meulemans, A., Fourie, L., Marc Heyndrickx, Mahillon, J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* -associated food poisoning. *J Clin Microbiol.* 43 (8): 4277–4279.
- Djenane, D., Aïder, M., Yangüela, J., Idir, L., Gómez, D., Roncalés, P. (2012). Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Sci*, 92(4): 667–674.
- do Carmo, L.S., Souza Dias. R., Linardi, R., de Sena, M.J., dos Santos, D.A., de Faria, M.E., Pena, C.E., Jett, M., Heneine, L.G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* 19: 9–14.
- Doijad, S.P., Barbuddhe, S.B., Garg, S., Poharkar, K.V., Kalorey, D.R. Kurkure, N.V., Rawool, D. B., Chakraborty, T. (2015) Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLOS ONE* 10(9): e0137046.
- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cyanide. *Biochem. Pharmacol.* 74: 831–840.
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., Zhang, L.H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 3526–31.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., Zhang, L.H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813–817.
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., Zhang, L.H. (2002) Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol.* 68: 1754–1759.
- Dong, Y.H., Zhang, L.H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol.* 43:101–109.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8 (9): 881–890.
- Donlan, R.M. (2000). Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAJO J.* 46: 47-52.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308–316.
- Dubey, G. P., Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell.* 144 (4): 590–600.
- Duguid, J. P., Anderson, E. S., Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J Pathol Bacteriol.* 92 (1): 107-138.
- Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 15: 155–166.
- Dušan, F., Marián, S., Katarína, D., Dobroslava, B. (2006). Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol in Vitro*, 20(8): 1435–1445.
- Dykes, G. A., Dworaczek (Kubo), M. (2002). Influence of interactions between temperature, ferric ammonium citrate and glycine betaine on the growth of *Listeria monocytogenes* in a defined medium. *Lett Appl Microbiol.* 35(6): 538-42.
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., Oppenheimer, N.J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochem.* 20: 2444–2449.
- EFSA (2013). The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J*, 11: pp. 3129–3378.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S. (2004). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res.* 48 (7): 479–487.
- Elhariry, H. M. (2011). Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiol.* 28 (7): 1266–1274.



- Elias, S., Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.* 36 (5): 990–1004.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Contr.* 22(6): 896–902.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., Ramos, J. (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J Bacteriol.* 182: 2363-2369.
- Faleiro, M.L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. In: Mendes-Vilas, A. (szerk.) Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Formatex, p: 1143-1156.
- Farber, J. M., P.I. Peterkin (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 55: 476-511.
- Farber, J.M., Peterkin, P. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-511.
- Fetsch, A., Contzen, M., Hartelt, K., Kleiser, A., Maassen, S., Rau, J., Kraushaar, B., Layer, F., Strommenger, B. (2014). *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. *Int J Food Microbiol.* 187: 1–6.
- Fleet, G.H. (1990). Yeasts in dairy products. *J Appl Bacteriol.* 68 (3): 199–211.
- Foong, S., Dickson, C.C., James S. (2004) Survival and recovery of viable but nonculturable *Listeria monocytogenes* cells in a nutritionally depleted medium. *J Food Protect.* 67 (8): 1641-1645.
- Frank, J. F., Ehlers, J., Wicker, L. (2003). Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static condions. *Food Prot Trends.* 23: 654-663.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., Sakagami, H. (2002). Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicol* 177: 39–54.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 176 (2): 269–275.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D., Farver, T.B. (1991). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30 degrees C. *J Food Prot.* 54 (9): 662-668.
- Ghosh, R., Nadiminty, N., Fitzpatrick, J.E., Alworth, W.L., Slaga, T.J., Kumar, A.P.( 2004). Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. *J Biol Chem* 280: 5812–5819.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Agapi Doulgerak, Nychas, G-J., Kacániová, M., Czaczuk, K., Ölmez, H., Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 6, 1–26.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., Nychas, G.J. (2013) Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLOS ONE* 8(10): e77276.
- Gibson, J., Sood, A., Hogan, D. A. (2009). *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: Localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. *App Environ Microbiol.* 75(2): 504–513.
- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P. and Holley, R.A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int J Food Microbiol.* 73: 83– 92.
- Giltner, C. L., Nguyen, Y., and Burrows, L. L. (2012). Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76: 740–772
- Girenavar, B., Cepeda, M. L., Soni, K. A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G. K., Suresh D. Pillai, Patil, B. S. (2008). Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *Int J Food Microbiol.* 125 (2): 204–208.
- González Barrios, A.F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E., Wood, T. K. (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol.* 188(1): 305–316.

- Grounta, A., Doulgeraki, A.I., Panagou, E.Z. (2015). Quantification and characterization of microbial biofilm community attached on the surface of fermentation vessels used in green table olive processing. *Int J Food Microbiol.* 203: 41–48.
- Gupta, A., Duhan, J., Tewari, S., Sangwan, P., Yadav, A., Singh, G., Juneia, R., Saini, H. (2013). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: A preliminary study. *Inter Endodont J.* 46 (8): 775–783.
- Gupta, C., Garg, A.P., Uniyal, R.C., Kumari, A. (2008). Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens. *Afr J Microbiol.* 2: 258–261.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* 26: 142–150.
- Gülçin I. (2004) Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Turk J Agric For.* 28: 25–33.
- Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Morita, H. (2003). Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(6): 3668–3671.
- Hennekinne, J.A., De Buyser, M.L., Dragacci, S., (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* 815–836.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Høiby, N., Givskov, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 22 (15): 3803–3815.
- Hingston, P. A., Stea, E.C., Knøchel, S., Hansen, T. (2013). Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces. *Food Microbiol.* 36: 46–56.
- Hoque, M, Bari, M.L., Juneja, V. K., Kawamoto, S. (2008) Antimicrobial activity of cloves and cinnamon extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria, and inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground chicken meat with their essential oils. *Rep. Nat. Food Res. Inst.* 72: 9–21.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 67 (7): 2982–2992.
- Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., Leadbetter, J.R. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5941–5949.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* 3:1–24.
- Inouye, S., Uchida, K., Nishiyama, Y., Hasumi, Y., Yamaguchi, H., Abe, S. (2007). Combined effect of heat, essential oils and salt on the fungicidal activity against *Trichophyton mentagrophytes* in foot bath. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 48 (1): 27–36.
- Irie, Y., Keung, W. M., 2003. Rhizoma acori graminei and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid-beta peptide. *Brain Res* 963, 282–289.
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe, Y. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature.* 465: 346–349.
- Jakobsen, M., Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int Dairy J.* 6: 755–768.
- Jensen, V., Löns, D., Zaoui, C., Bredenbruch, F., Meissner, A., Dieterich, G., Münch, R., Haussler, S. (2006). RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. *J Bacteriol.* 188: 8601–8606.

- Jia, P., Xue, Y. J., Duan, X. J., Shao, S. H. (2011). Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and *sarA* expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4): 409–416.
- Kaplan, J.B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D.H., Ramasubbu, N. (2004) Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2633–2636.
- Karabagias, I., Badeka, A., Kontominas, M. G. (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Sci*, 88(1): 109–116.
- Khan, M. S. A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F. M., Ahmad, I. (2009). Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Lett Appl Microbiol*, 49(3): 354–360.
- Khanjari, A., Karabagias, I. K., Kontominas, M. G. (2013). Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. *LWT - Food Sci Technol.* 53 (1): 94–99.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol.* 48: 1511–1524.
- Kline, K.A., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe.* 5: 580–592.
- Kodach, L.L., Bos, C.L., Durán, N., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V., Hardwick, J.C. (2006). Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinog.* 27 (3): 508–16.
- Kruijt, M., Tran, H., Raaijmakers, J.M. (2009) Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *J Appl Microbiol.* 107: 546–556.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J., Bloemberg, G.V. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol.* 51: 97–113.
- Kumar, C.G., Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol.* 42:9–27.
- Kumar, M. R. (2012). *Chromobacterium violaceum*: A rare bacterium isolated from a wound over the scalp. *Int J Appl Basic Med Res.* 2 (1): 70–72.
- Leonard, C. M., Virijevic, S., Regnier, T., Combrinck, S. (2010). Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *South Afr J Bot.* 76 (4): 676–680.
- Liang, Z., Cheng, Z., Mittal, G.S. (2003). Inactivation of microorganisms in apple cider using spice powders, extracts and oils as antimicrobials with and without low-energy pulsed electric field. *Food Agric Environ.* 1: 28–33.
- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(7): 1–11.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2003): Brock biology of microorganisms, Tenth Edition., New Jersey: Pearson Education, Inc., AEÁ, 1019 p.
- Magyar Élelmiszerkönyv 2-81 számú irányelv, Sütőipari termékek.
- McAlester, G., O’Gara, F., Morrissey, J. P. (2008). Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 57 (5), 563–569.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Mavis Daykin, Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B, Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiol.* 143: 3703–3711.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L. Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Williams, P. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol.* 143 (12): 3703–3711.

- Meng-Ying, L., Ji, Z., Peng, L., Jing-Liang, X., Shung-Peng, L. (2009). Evaluation of biological characteristics of bacteria contributing to biofilm formation. *Pedosphere*. 19 (5): 554-561.
- Morild, R. K., Olsen, J. E., Aabo, S. (2011). Change in attachment of *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, and *Listeria monocytogenes* to pork skin and muscle after hot water and lactic acid decontamination. *Int J Food Microbiol*. 145 (1), 353–358.
- Naimi, T. S., Wicklund, J. H., Olsen, S. J., Krause, G., Wells, J. G., Bartkus, Jo.M., Boxrud, D. J., Sullivan, M., Kassenborg, H., Besser, J. M., Mintz, E. D., Osterholm, M. T., Hedberg, C. W. (2003). Concurrent outbreaks of *shigella sonnei* and enterotoxigenic *escherichia coli* infections associated with parsley: implications for surveillance and control of foodborne illness. *J Food Prot*. 4: 535-709.
- Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S., Akkermans, A.D., de Vos, W.M., Nagasawa, H. (2001). Gelatinase biosynthesis activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*. 41: 145–54.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharm*. 6 (12): 1451–1474.
- Niu, C., Gilbert, E. S. (2004). Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Am Soc Microbiol*. 70 (12): 6951-6956.
- Olsen, S. J., Patrick, M., Hunter, S. B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W. R., Lane, K., Bidol, S., Stoltman, G.A., Frye, D.M., Lee, I., Hurd, S., Jones, T.F, LaPorte, T.N., Dewitt, W., Graves, L., Wiedmann, M., Schoonmaker-Bopp, D.J., Huang, A.J., Vincent, C., Bugenhagen, A., Corby, J., Carloni, E.R., Holcomb, M.E., Woron, R.F., Zansky, S.M., Dowdle, G., Smith, F., Ahrabi-Fard, S., Ong, A.R., Tucker, N., Hynes, N.A., Mead, P. (2005). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clin Inf Dis*. 40 (7): 962–967.
- Pan, Y., Breidt Jr., F., Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl Environ Microbiol*. 72 (12): 7711-7717.
- Papp, J. (2009). A baktériumok biotikus kapcsolatai. In: Papp, J.(szerk.), Általános mikrobiológia I., Kriterion, Kolozsvár, p.183-185.
- Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L. Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A., Dewhirst, F.E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 183: 3770–3783.
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kaloera, Z., Blazevic, N. (2005). Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharm*. 55: 417–422.
- Pesti M. (szerk) Általános mikrobiológia. Dialóg Campus, Budapest-Pécs. 2001.
- Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Meth*. 72: 157 - 165.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonc, alves, M., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A. and Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol*. 49: 1367–1373.
- Pohlschroder, M., Esquivel, R. N. (2015). Archaeal type IV pili and their involvement in biofilm formation. *Front Microbiol*. 6: 190.
- Ponce, A.G., Valle, C. Del, Roura S.I. (2004). Shelf life of leafy vegetables. 69(2): 50–56.
- Poulose, A.J., Croteau, R. (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of  $\gamma$ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Arch Biochem Biophys*. 187: 307–314.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Compl AlterMed*, 6, 39.
- Prakash, B., Veerogowda, B.M., Krishnappa, G. (2003). Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr Sci*. 85 (9): 1299-1307.
- Priha, O., Juvonen, R., Tapani, K., Storgards, E. (2011). Acyl homoserine lactone production of brewery process surface bacteria. *J Inst Brew*. 117(2): 182–187.

- Radácsi, P., Inotai, K., Sárosi, Sz., Czövek, P., Bernáth, J and Németh, É. (2014). Effect of water supply on the physiological characteristic and production of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Eur J Hort Sci.* 75: 193-197.
- Rahman, A., Kang, S.C. (2009). In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica*. *Thunb Food Chem.* 116 (3): 670-675.
- Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. (2007). *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 40 (1), 4–13.
- Rayner, J., Veeh, R., Flood, J. (2004). Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. *Int J Food Microbiol.* 95: 29 - 39.
- Rendueles, O., Ghigo, J. M. (2012). Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.* 36 (5): 972–989.
- Rieu, A., Lemaître, J. P., Guzzo, J., Piveteau, P. (2008). Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*, 126(1–2): 76–82.
- Rimini, S., Petracci, M., Smith, D. P. (2014). The use of thyme and orange essential oils blend to improve quality traits of marinated chicken meat. *Poul Sci.* 93(8): 2096–2102.
- Røder, H. L., Raghupathi, P. K., Herschend, J., Brejnrod, A., Knøchel, S., Sørensen, S. J., Burmølle, M. (2015). Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiol*, 51: 18–24.
- Rodler Imre (szerk.) Élelmezés - és táplálkozás egészségtan. Medicina, Budapest, 2005.
- Roller, S., Seedhar, P. (2002). Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C. *Lett Appl Microbiol.* 35 (5): 390–394.
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R. (2008). The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomed.* 15: 635–638.
- Sakaridis, I., Soultos, N., Dovas, C.I., Papavergou, E., Ambrosiadis, I., Koidis, P. (2012). Lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Anaerobe.* 18: 62-66.
- Sandasi, M., Leonard, C. M., Viljoen, A. M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Contr.* 19 (11): 1070–1075.
- Schelz, Zs., Hohmann, J., Molnár, J. (2010). Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. *Ethnomed.* 661 (2): 179–201.
- Seiler, H. (1991). Some additional physiological characteristics for the identification of food-borne yeasts. *Neth Milk Dairy J.* 45: 253–258.
- Selim, S. A, Adam, M. E., Hassan, S. M., Albalawi, A. R. (2014). Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 14 (1): 179.
- Sharifzadeh, A., Khosravi, A. R., Ahmadian, S. (2016). Chemical composition and antifungal activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* isolates from buccal lesions of HIV+ individuals. *Micro Pathog*, 96, 1–9.
- Shi, X., Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Sci Technol.* 20 (9), 407–413.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M. R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol.* 62: 1264–1277.
- Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Kowalczyk, E., Szymańska, G., Kochan, E., Krukowska, J., Olszewski, J., Zielińska-Bliźniewska, H. (2016). The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *Burns*, 1–8.-in press
- Simić, A., Soković, M. D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytother Res.* 18 (9): 713–717.

- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT Food Sci Technol.* 43: 573–583.
- Skandamis, P. N., Stopforth, J. D., Ashton, L. V., Geornaras, I., Kendall, P. A., Sofos, J. N. (2009). *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. *Food Microbiol.* 26 (1): 112–119.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *J Food Microbiol.* 18: 463–470.
- Song, Z., Kong, K.F., Wu, H., Maricic, N., Ramalingam, B., Priestap, H., Schneper, L., Quirke, J.M.E., Hřiby, N., Mathee, K. (2010). *Panax ginseng* has anti-infective activity against opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing, a bacterial communication process critical for establishing infection. *Phytomed.* 17: 1040–1046.
- Souza, C. M. C., Junior, S. A. P., Moraes, T. D. S., Damasceno, J. L., Mendes, S. A., Dias, H. J., Stefani, R., Crispim Tavares, D., Gomes Martins, C. H., Miller Crotti, A. E., Soares Mendes-Giannini, M. J., Pires, R. H. (2016). Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. *Med Mycol.* 54(5): 515–523.
- Srey, S., Jahid, I. K., Ha, S. Do. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Contr.* 31 (2): 572–585.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L., von Wright, A., (1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem Toxicol.* 37: 813–823.
- Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol.* 147: 3–9.
- Tachikawa, M., Yamanaka, K., Nakamuro, K. (2009). Studies on the disinfection and removal of biofilms by ozone water using an artificial microbial biofilm system. *Ozone: Sci Eng.* 31 (1): 3–9.
- Taormina, P.J., Beuchat, L.R. (2002) Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *J Appl Microbiol.* 92: 71–80.
- Thomson, N.R., Crow, M.A., McGowan, S.J., Cox, A., Salmond, G.P. (2000) Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* 36: 539–556.
- Toté, K., Horemans, T., Vanden Berghe, D., Maes, L., Cos, P. (2010). Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 76 (10): 3135–3142.
- Tserennadmid, R. (2010). Illóolajok és kombinációik hatása az élelmiszerromlást okozó mikroorganizmusokra. Doktori értekezés, Szeged, p. 54–55.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., Krisch, J. (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol.* 144 (3): 480–486.
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food Chem Toxicol.* 48 (11): 3274–3280.
- Valeriano, C., Leandro, T., Oliveira, C. De, Mal, S., Carvalho, D., Cardoso, G., Alves, E., Hilsdorf Piccoli, R. (2012). The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Contr.* 25: 673–677.
- Valle, J., Da Re, S., Schmid, S., Skurnik, D., D’Ari, R., Ghigo, J. (2008) The amino acid valine is secreted in continuous-flow bacterial biofilms. *J Bacteriol.* 190: 264–274.
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour- Lambert, P, Ghigo, J. (2006). Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *P Natl Acad Sci USA.* 103: 12558–12563.
- Van Houdt, R., Givskov, M., Michiels, C. W. (2007). Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev.* 31 (4): 407–424.
- Van Houdt, R., Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol.* 109 (4): 1117–1131.

- Vu, K.D., Hollingsworth, R.G., Leroux, E., Salmieri, S., Lacroix, M. (2011) Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries, *Food Res Int*, 44: 198 – 203.
- Wadhams, G. H., Armitage, J. P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis *Nature Rev Mol Cell Biol*. 5: 1024-1037.
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., Iglewski, B.H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol*. 185 (7): 2080-2095.
- Walker, J.T., Marsh, P.D. (2007). Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. *J Dentistry*. 35 (9): 721-730.
- Walker, G.M. (2011). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *A. van Leeuwenhoek*. 99: 25-34.
- Wang, H., Ye, K., Wei, X., Cao, J., Xu, X., Zhou, G. (2013) Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. *Food Contr*. 33: 378–384.
- Wang, Y., Dai, Y., Zhang, Y., Hu, Y.B., Yang, B.Y., Chen, S.Y. (2007). Effects of quorum sensing autoinducer degradation gene on virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci China Ser C-Life*. 50 (3): 385-391.
- Waters, C. M., Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 21 (1): 319–346.
- Waters, C. M., Bassler, B. L. (2006). The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers *Genes Dev*. 2754–2767.
- Wattanavanitchakorn, S., Prakitchaiwattana, C., Thamyongkit, P. (2014). Rapid and simple colorimetric method for the quantification of AI-2 produced from *Salmonella Typhimurium*. *J Microbiol Meth*. 99 (1): 15–21.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 295: 1487.
- Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., Jorgensen, F., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P., Stewart, G. S. (1998). Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* 163: 185-192.
- Winzer, K., Hardie, K. R., Burgess, N., Doherty, N., Kirke, D., Holden, M. T., Kenneth, A RL, Cornell, Taylor, A J., Hill, P J., Williams, P. (2002). LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiol*. 148 (4): 909–922.
- Xavier, K. B., Bassler, B.L. (2005). Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 187: 238–48.
- Yun, J., Fan, X., Li, X. (2013). Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and quality maintenance of cherry tomatoes treated with gaseous essential oils. *J Food Sci*. 78:3.
- Zhan, X.M., Rodgers, M., O'Reilly, E. (2006). Biofilm growth and characteristics in an alternating pumped sequencing batch biofilm reactor. *Water Res*. 40: 817 – 825.

#### Internetes források:

- <http://aromax.hu/hu/termekeink/reszletek/citromolaj/>, Letöltés dátuma: 2016.11.20
- <http://aromax.hu/hu/termekeink/reszletek/fahejolaj/>, Letöltés dátuma: 2016.11.20
- <http://aromax.hu/hu/termekeink/reszletek/muskotalyzsalyaolaj1/>, Letöltés dátuma: 2016.11.20
- [http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/2011\\_0001\\_521\\_Elelmiszer-mikrobiologia/ch08s02.html](http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Elelmiszer-mikrobiologia/ch08s02.html), Letöltés dátuma: 2016.11.24
- [www.néhib.hu](http://www.néhib.hu), Letöltés dátuma: 2017.01.10



## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek Prof. Dr. Vágyvölgyi Csaba, tanszékvezető, egyetemi tanárnak és Dr. Krisch Judit egyetemi docensnek, akik bizalmat szavaztak nekem, amikor külföldi ösztöndíjas hallgatóként befogadtak, és szakmai tanácsaikkal valamint emberileg nyújtott lelkiismeretes és önzetlen támogatásukkal segítettek diplomadolgozatom, majd később Ph.D munkám előrehaladását. Köszönöm Dr. Papp Judit volt témavezetőmnek biztatásait és hasznos tanácsait, amelyekkel elindított ezen az úton.

Külön hálás vagyok Dr. Takó Miklósnak, aki szakdolgozó korom óta biztatott és ellátott a labormunka elvégzéséhez szükséges szakmai tanácsokkal.

Köszönöm Petkovits Tamásnak az elektronmikroszkópos felvételek elkészítése során kapott hasznos tanácsait valamint Vörös Mónikának az izolátumok azonosításában nyújtott segítségét.

Köszönetet mondok közvetlen munkatársaimnak Dr. Kotogán Alexandrának, Vidács Anitának, Gömöri Csillának, Kiss Noéminek, Tóth Liliánának, Dr. Baranyi Nikolettnek, Dr. Homa Mónikának és Dr. Virágh Máténak a laborban nyújtott segítségükért és töretlen biztatásukért. Külön köszönöm Nacsa-Farkas Elvirának a sok technikai segítségét és baráti tanácsait.

Köszönöm Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a munkám során nyújtott technikai segítségüket.

Köszönöm továbbá a Szegedi Tudományegyetem TTIK Mikrobiológiai Tanszék összes munkatársának, akik a baráti légkör kialakításával nagyban hozzájárultak munkám végzéséhez.

Hálásan köszönöm szüleimnek az éveken át tartó biztatást és töretlen bizalmukat, valamint szeretteimnek, barátaimnak és páromnak a sok támogatást és türelmet.