

Doktori értekezés tézisei

**Élelmiszeriparban használható illóolajok fertőtlenítő
és antimikrobiális hatásának vizsgálata**

Vidács Anita

Témavezetők:

Dr. Krisch Judit

egyetemi docens

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba

tanszékvezető egyetemi tanár



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

2018

BEVEZETÉS

A baktériumok képesek az élelmiszeriparban és egészségügyben található különböző felületeken megtapadni, és ott biofilmet létrehozni. Ebben a komplex rendszerben a baktériumok ellenállóbbak a káros környezeti hatásokkal szemben. A biofilmek elleni védekezés első feladata a tapadás gátlása. Ha a tapadás kialakult a kolónia eltávolítása nehezebb.

A fertőtlenítőszernek való hosszabb idejű kitettség növelheti a baktériumok ellenállását, ezért folyamatos a kutatás új antimikrobiális hatással rendelkező anyagok irányába. Az illóolajokat különböző növényekből vonják ki, melyek antimikrobiális, antifugális, antivirális hatással rendelkeznek. Többsége a Food and Drug Administration (FDA) által felállított GRAS (általánosan biztonságosnak elfogadott) kategóriába esik.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk fő célkitűzése egy természetes hatóanyagot (illóolajat) tartalmazó fertőtlenítőszer kifejlesztése volt, amely hatékonyan képes gátolni a bakteriális biofilmek kialakulását szilárd felületen.

1. Kiválasztott illóolajok antimikrobiális hatásának vizsgálata.
2. Illóolaj keverékek antibakteriális hatásának vizsgálata és jellemzése.
3. Illóolajok tapadást gátló hatásának vizsgálata élelmiszeriparból származó felületeken; beleértve a technológiai folyamatokra jellemző variációkat (tisztá és élelmiszermaradványt tartalmazó felületek).
4. Az illóolajok baktericid kinetikájának meghatározása.
5. Illóolajos fertőtlenítőoldat különböző érettségű biofilmekre gyakorolt hatásának vizsgálata.
6. Vegyes populációjú biofilm képzés csempe, fém, műanyag és fa felületen; a biofilm képzés gátlásának vizsgálata.
7. Természetes alapú fertőtlenítőszer optimalizálása és hatékonyságának ellenőrzése.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Vizsgált mikroorganizmusok: *Bacillus cereus* var. *mycoides* SZMC 0042, *Bacillus subtilis* SZMC 0209, *Escherichia coli* SZMC 0582, *Listeria monocytogenes* SZMC 21307, *Staphylococcus aureus* SZMC 110007, *Staphylococcus aureus* (MRSA) SZMC 6270, *Pseudomonas putida* SZMC 291T
Vegyes tenyészet tagjai: *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. putida*, *S. aureus*.

Vizsgált illóolajok: boróka, citrom, fahéj, kakukkfű, majoránna, muskotályzsálya.

Izolált baktériumok azonosítása:

- mintavételi helyek: fagyasztott péksüteményeket gyártó üzem, hústerméket előállító tanüzem,
- baktériumok azonosítása: genomi DNS tisztítása, agaróz gélelektroforézis, PCR, DNS szakaszok szekvenálása és elemzése, nukleotid szekvenciák analízise (BLAST).

Minimális gátló és baktericid koncentráció meghatározása;

kölcsönhatás az illóolajok között:

- mikrohígítási módszer; saktábla módszer
- rezazurinos festés,
- szélesztés.

Baktériumok tapadó képességének meghatározása:

- tapadás vizsgálat polipropilén és rozsdamentes acél felületen négy óra hosszán át, óránként mintavétel,

- három leghatásosabb illóolaj vizsgálata (majoránna, kakukkfű, fahéj),
- illóolajos (szubletális koncentráció) közegben,
- élelmiszerüzemi modell: paradicsompüré és csirkemell lé élelmiszermaradvány a felületen, a megtapadásra és az illóolajok tapadást gátló hatására kifejtett hatás,
- illóolajjal bevont felületek hogyan befolyásolják a bakteriális tapadást,
- DAPI festés és mikroszkópos vizsgálat.

Illóolajok baktericid kinetikájának vizsgálata:

- koncentráció és/vagy a pH hogyan befolyásolja az illóolajok hatását szabad sejtek esetén,

Biofilmek vizsgálata és eltávolítása:

- polipropilén és rozsdamentes acél felületeken,
- 24 és 168 órás biofilmek vizsgálata
- a kísérletekben megállapított paraméterek alapján a felületek fertőtlenítése illóolajos oldattal,
- sejtszám meghatározás szélesztéssel.

Vegyes tenyésztű biofilmek vizsgálata:

- felületek: polipropilén, rozsdamentes acél, csempekerámia, fa
- 24 és 168 órás biofilmek képzése és fertőtlenítése a fent megállapított paraméterű illóolajos fertőtlenítőoldattal
- összes és faj szerinti sejtszám meghatározása a fertőtlenítés után általános és szelektív táptalajokon.

Fertőtlenítőszer optimalizálás :

- Design of Expert 9 program: Box-Behnken Response Surface Design,

- független változók: koncentráció (1-3x MBC), idő (10-110 min) és pH (4,5-7,5),
- baktériumok: modell organizmusok: *E. coli* és *L. monocytogenes* (polipropilén felületen); vegyes tenyészet (polipropilén és fa felület),
- 24 órás biofilm vizsgálat,
- összehasonlítás jelenleg használatos fertőtlenítőszerrel.

Elektronmikroszkópos felvételek:

- 24 és 168 órás biofilm képzése műanyag és fa felületen,
- felvételek készítése a felületeken lévő biofilmekről a fertőtlenítés előtt és után pásztázó elektronmikroszkóp segítségével.

ELÉRT EREDMÉNYEK - TÉZISEK

A felületekről izolált baktériumok az alábbi nemzetségekbe tartoztak: *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp.

A vizsgált illóolajok közül fahéj, majoránna és kakukkfű jó antibakteriális hatással rendelkezett. A boróka, citrom és muskotályzsálya illóolaj ezzel szemben kevésbé volt hatékony, a legtöbb vizsgált baktériumon a ≥ 100 mg/ml feletti minimális gátló koncentrációt kaptunk, így ezeket az illóolajokat kihagytuk a további vizsgálatokból. Összességében az általunk izolált baktériumok és a törzsgyűjteményből származó Gram-negatív baktériumok ellenállóbbnak bizonyultak az illóolajokkal szemben. A vizsgált illóolajok igen hatékonyak voltak az MRSA-val és *L. monocytogenes*-szel szemben is.

1. Megállapítottuk, hogy az illóolajok kölcsönhatása akkor a legerősebb, ha legalább az egyik illóolaj tartalmazott fenolos jellegű komponest (tímol – kakukkfű).

A legtöbb esetben additív vagy szinergista hatást értünk el, kivéve az ipari izolátumok esetén, ahol indifferens volt a hatást.

2. Bizonyítottuk, hogy a fahéj, kakukkfű, majoránna illóolajok szubletális koncentrációban szignifikánsan csökkentették akár gátolták is a rozsdamentes acélra és polipropilén felületre letapadt baktériumok számát. Emellett bizonyítottuk, hogy a felület maga nem befolyásolja a baktériumok kitapadási képességét,

ellentétben a felületek élelmiszermaradványokkal való szennyezettségével.

Élelmiszermaradványok nagymértékben elősegítették a baktériumok tapadását, és rontották az illóolajok gátló hatását.

Elsősorban a fehérje jellegű szennyeződések okozták ezt a hatást, mert az aldehides illóolaj összetevőket, mint a fahéjaldehyd, a fehérjék képesek kovalensen kötni, és ez okozza a gátló hatás csökkenését. Ha a fehérjéket eltávolítottuk a szennyeződésből, a gátló hatás visszatért.

3. Az ipari követelményeknek megfelelő, fahéj, kakukkfű és majoránna illóolaj alapú fertőtlenítőszer t állítottunk össze.

4. Rozsdamentes acél, valamint műanyag felületekre kitapadt biofilmek eltávolítását sikeresen hajtottuk végre savas kémhatású illóolajtartalmú (elsősorban majoránna olaj tartalmú) szerekkel. A fertőtlenítés jobb hatású volt fém felületen, mint műanyagon.

Az érett biofilmek (168 órás) eltávolítása, illetve sejtszám csökkentése könnyebb volt, ami talán a tápanyagforrások kimerülésével és a toxikus anyagok felhalmozódásával is kapcsolatban lehet. A legjobb hatást, azaz a biofilmek teljes megszüntetését majoránna illóolajjal értük el savas kémhatásnál, de a többi illóolaj is alacsony pH-n mutatta a

legjobb hatást. Savas kémhatás mellett a legtöbb illóolaj összetevő nem-disszociált állapotban van, és erősen hidrofób, ami lehetővé teszi számukra, hogy átjussanak a baktériumok sejthártyáján, és zavart okozzanak a normál sejtműködésben.

5. Optimalizáltunk egy természetbarát, majoránna és fahéj illóolaj alapú (pH=4,5) fertőtlenítőszert, mely alkalmas rozsdamentes acél, polipropilén, csempe és fa felületeken kialakult biofilmek eltávolítására egyaránt. Az iparban és a háztartásokban ritkán alakulnak ki egyfajú biofilmek, sokkal jellemzőbbek a vegyes közösségek. Az optimalizálást a Box-Behnken kísérlettervezési módszer segítségével végeztük. A legnehezebben fertőtleníthető, fa felület, tekintve, **az ajánlott illóolaj koncentráció 60 mg/ml majoránna és 12,5 mg/ml fahéj.** A fertőtlenítési idő felülettől függően 10 és 30 perc között változik.

ÖSSZEFOGLALÁS

- A vizsgált illóolajok antibakteriális hatással rendelkeztek, a legígéretesebb a fahéj, kakukkfű és majoránna volt.
- Azon illóolaj keverékek között volt szinergista, additív hatás, ahol az egyik tag fő komponense fenol típusú vegyület.
- Tapadás során nem volt különbség a polipropilén és rozsdamentes acél felületen megtapadt sejtek számában. Az illóolajok képesek csökkenteni a megtapadt sejtek számát, akár gátolták is. Az élelmiszermaradványok a felületen elősegítik a megtapadást és csökkentik az illóolajok hatását.
- A koncentráció növelés és pH változtatás elősegíti az illóolajok antibakteriális hatását.
- Különbség van az iparból izolált baktériumok és az SZMC törzsgyűjteményből származó baktériumok érzékenysége között.
- A 24 órás biofilm esetén több sejt volt a mátrixban, mint a 168 órásban. Az illóolajos fertőtlenítőszer eltávolították a biofilmeket a felületről.
- A kevert tenyészetű biofilmek esetén főleg a Gram-negatív baktériumok voltak jelentősebb számban. A fa felület fertőtlenítése nehezebb a porózussága miatt.
- Az optimalizálás során kapott fertőtlenítőszer hatása megegyezett vagy jobb is volt, mint az iparban/háztartásokban használt fertőtlenítőszerké.

I. A DOKTORI ELJÁRÁS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Anita Vidács, Erika Kerekes, Róbert Rajkó, Tamás Petkovits, Naiyf S Alharbi, Jamal M Khaled, Csaba Vágvolgyi, Judit Krisch. Optimization of essential oils-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. *Journal of Molecular Liquids* 255: pp. 257-262. (2018) ISSN 0167-7322 (IF: 3,648; Q1)

Erika-Beáta Kerekes, **Anita Vidács**, Julianna Jenei Török, Csilla Gömöri, Tamás Petkovits, Muthusamy Chandrasekaran, Shine Kadaikunnan, Naiyf S Alharbi, Csaba Vágvolgyi, Judit Krisch. Anti-listerial effect of selected essential oils and thymol. *Acta Biologica Hungarica* 67:(3) pp. 333-343. (2016). (IF: 0,506; Q3)

II. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI SZAKMAI ANYAGOK

a/ Referált folyóiratban megjelent közlemények

Csilla Gömöri, **Anita Vidács**, Erika Beáta Kerekes, Elvira Nacsa-Farkas, Andrea Böszörményi, Csaba Vágvolgyi, Judit Krisch. Altered antimicrobial and anti-biofilm forming effect of thyme essential oil due to changes in composition. *Natural Product Communication* Vol. 13. In press (2018) (IF:0,773)

b/ Egyéb kapcsolódó szakmai anyagok

Anita Vidács, Róbert Rajkó, Vágvolgyi Cs, Judit Krisch. WASET (szerk.). Application of Box-Behnken Response Surface Design for Optimization of Essential Oil Based Disinfectant on Mixed Species Biofilm. WASET, 2017. 1383 p. (International Science Index, Nutrition and Food Engineering, 11(12)

Vidács A, Rajkó R, Vágvolgyi Cs, Krisch J. Essential oil based disinfectants for biofilm elimination from stainless steel and plastic surfaces. In: 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT)

Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts. 65 p. (ISBN:978-963-306-535-8)

Anita Vidács, Judit Krisch, Csaba Vágvolgyi. Disinfection effect of essential oils on developing or matured bacterial biofilms. In: 30th EFFoST International Conference: Targeted Technologies for Sustainable Food Systems. Paper P2.68.

Anita Vidács. Essential oils as alternative disinfectants in the food industry. *Acta Biologica Szegediensis* 60:(1) p. 95. (2016). Conference For Doctoral Students In Biology.

Vidács A, Vágvolgyi Cs, Krisch J. Anti-adhesion effect of essential oils. In: International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research (ICoSTAF'16): Proceedings. Paper Vidacs_anti adhesion essential oils. 5 p.

Vidács A, Vágvolgyi Cs, Krisch J. Anti-adhesion effect of essential oils. In: Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecília Hodúr, Judit Krisch (szerk.). International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research (ICoSTAF'16): Book of Abstracts. 58 p. (ISBN:978-963-306-482-5)

Anita Vidács, Judit Krisch, Muthusamy Chandrasekaran, Shine Kadaikunnan, Naiyf S Alharbi, Csaba Vágvolgyi. Potential use of essential oils for surface disinfection. In: 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015). Paper FEMS-0987.

Anita Vidács, Judit Krisch, Csaba Vágvolgyi. Illóolajok felhasználása élelmiszeriparban használható fertőtlenítőszerekben. In: Gelencsér Éva, Horváth Zoltánné (szerk.). Aktualitások a táplálkozástudományi kutatásokban című V. PhD Konferencia összefoglalói. 36 p. (ISBN:978-963-88108-8-5)

Anita Vidács, Antal Véha, Ernő Gyimes, Csaba Vágvölgyi, Judit Krisch. New natural disinfectants: essential oils. In: 17th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and Abstracts. 78 p. (ISBN:978-963-306-374-3)

Anita Vidács, Csaba Vágvölgyi, Erika Kerekes, Judit Krisch. Inhibition of bacterial attachment and biofilm formation on food industry surfaces using essential oils. *Natural Volatiles & Essential Oils* p.143.

Vidács A, Kerekes EB, Krisch J, Vágvölgyi C. Antibacterial effect of essential oil combinations. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* 62:(S2) p. 239. (2015)

Anita Vidács, Antal Véha, Csaba Vágvölgyi, Judit Krisch. Antibacterial effect of selected essential oils as candidates for disinfectants in food industry. In: Second International Congress Food Technology, Quality and Safety. p. 18.

Vidács A, Krisch J, Vágvölgyi Cs. Disinfection action of some essential oils on stainless steel. In: Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecília Hodúr, Judit Krisch (szerk.). ICoSTAF'14: 56 p. (ISBN:978-963-306-276-0)

Vidács A, Krisch J, Vágvölgyi C. Disinfection action of some essential oils on stainless steel. *Review Of Faculty Of Engineering Analecta Technica Szegedinensia* 2014:(1) pp. 18-21. (2014). (ISBN 2064-7964)

Vidács A, Véha A, Vágvölgyi Cs, Krisch J. Antibacterial effect of selected essential oils as possible disinfectants in food industry. In: Second International Congress Food Technology, Quality and Safety. pp. 546-549.

Erika Beáta Kerekes, Csilla Gömöri, **Anita Vidács**, Elvira Nacsa-Farkas, Andrea Böszörményi, Nadeen Moustafa Zouabi, Csaba Vágvölgyi, Judit Krisch. Marjoram essential oil: changes

in composition and effectiveness against bacterial biofilms. *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Abstract Book*, p 95. ISBN 978-963-315-370-3 (2018)

Kerekes EB, **Vidács A**, Gömöri Cs, Nacsa-Farkas E, Takó M, Vágvölgyi Cs, Krisch J. Essential oils as food preservatives: from lab experiments to use in real foods. *Natural Volatiles & Essential Oils* 4:(3) p. 51. (2017).

Gömöri Cs, Nacsa-Farkas E, Kerekes EB, **Vidács A**, Bencsik O, Vágvölgyi Cs, Krisch J. Effect of cinnamon essential oil against aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. In: ICoSTAF'16: Proceedings. Paper Gomori_cinnamon against aflatoxin production. 5 p.

Kerekes EB, Kósa V, **Vidács A**, Vágvölgyi Cs, Krisch J. Effect of selected essential oils and their component on *Debaryomyces hansenii* biofilm formation. In: Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecília Hodúr, Judit Krisch (szerk.). ICoSTAF'16: Book of Abstracts. 58 p. (ISBN:978-963-306-482-5)

Kerekes EB, Kósa V, **Vidács A**, Vágvölgyi Cs, Krisch J. Effect of selected essential oils and their component on *Debaryomyces hansenii* biofilm formation. In: ICoSTAF'16: Proceedings. Paper Kerekes_essential oils yeast biofilm. 5 p.

Kerekes EB, **Vidács A**, Gömöri Cs, Takó M, Vágvölgyi Cs, Krisch J. Essential oils as new alternatives for food preservation. In: Mrša V, Teparić R, Kifer D (szerk.). *Power of Microbes in Industry and Environment 2016: Programme and abstracts*. 130 p. (ISBN:978-953-7778-14-9)

Kerekes EB, **Vidács A**, Vágvölgyi C, Krisch J. Mixed culture biofilms: inhibition with essential oils and their main components. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* 62:(S2) p. 163. (2015).

Kerekes EB, **Vidács A**, Török Jenei J, Gömöri C, Takó M, Chandrasekaran M, Kadaikunnan S, Alharbi NS, Krisch J, Vágvolgyi C. Essential oils against bacterial biofilm formation and quorum sensing of food-borne pathogens and spoilage microorganisms. In: Méndez-Vilas A (szerk.). *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Badajoz: Formatex Research Center, 2015. pp. 429-437. (Microbiology Book Series; 5.) Volume 1. (ISBN:978-84-942134-6-5)

Török Jenei Julianna, Horváth Györgyi, **Vidács Anita**, Véha Antal, Krisch Judit. Antifungal activities of selected essential oils. In: *Second International Congress Food Technology, Quality and Safety*. p. 191.

Török Jenei Julianna, Horváth Györgyi, **Vidács Anita**, Véha Antal, Krisch Judit. Antifungal activities of selected essential oils. In: *Second International Congress Food Technology, Quality and Safety*. pp. 550-553.

Krisch J, Kerekes E, Deák É, **Vidács A**, Vágvolgyi Cs. Antibiofilm forming and disinfectant effect of selected essential oils against mono- and mixed-culture bacterial biofilms. In: *FEMS 2013 5th Congress of European Microbiologists*. Paper 1077. 1 p.

III. Egyéb szakmai anyagok

a/ Egyéb referált folyóiratban megjelent közlemény

Cs. Gömöri, E. Nacsá-Farkas, E. B. Kerekes, A. Vidács, O. Bencsik, S. Kocsubé, J. M. Khaled, N. S. Alharbi, Cs. Vágvolgyi, J. Krisch. Effect of essential oil vapours on aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. *World Mycotoxin Journal* (2018) Accepted (IF: 2,189)

b/ Egyéb konferencia kivonatok

Gömöri Cs, Nacsa-Farkas E, Kerekes EB, **Vidács A**, Barna Zs, Róka E, Mészáros Basics B, Vágvölgyi Cs, Krisch. J. Water risk assesment - Legionella control in Hungary - results and experiences in our days. In: 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts. 65 p. (ISBN:978-963-306-535-8)

Gömöri Cs, Nacsa-Farkas E, Kerekes EB, **Vidács A**, Barna Zs, Róka E, Mészáros Basics B, Póda T, Vágvölgyi Cs, Krisch J. Presence of Legionella in water samples from community and industrial facilities. In: 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts. 65 p. (ISBN:978-963-306-535-8)

Kerekes EB, **Vidács A**, Takó M, Hargitai F, Komáromi L, Vágvölgyi Cs, Krisch J. Bacterial communication (quorum sensing) – impact on environment and health. In: 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts. 65 p. (ISBN:978-963-306-535-8)

A referált folyóiratokban megjelent közlemények összesített impakt faktora: 7,116