

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Illóolajok hatása bakteriális és élesztő biofilm képzésre és kapcsolat a quorum sensing (QS) mechanizmussal

Szerző:

Kerekes Erika-Beáta,

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Biológia és Geológia Kar, Biológiai
erőforrások kezelése és védelme szak, mesterképzés, II. év

Küldő intézmény neve: XV. Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencia (ETDK)

Témavezetők:

dr. Papp Judit egyetemi adjunktus,

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Biológia és Geológia Kar, Kísérleti Biológia
Tanszék

dr. Krisch Judit, egyetemi docens,

Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Élelmiszer-mérnöki Intézet

dr. Vágvölgyi Csaba, egyetemi tanár,

Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Természettudományi és Informatikai Kar,
Mikrobiológiai Tanszék

Tartalomjegyzék

Bevezető	4
I. Szakirodalmi áttekintés	5
1.1 A biofilmek általános jellemzése	5
1.2 A quorum sensing (QS) mechanizmus bemutatása	6
1.3 Mikroorganizmusok az élelmiszeriparban	7
1.4 Az illóolajok általános jellemzése	7
1.5 Az illóolajok antimikrobiális hatása	8
1.6 Az illóolajok hatása a biofilmek kialakulására	9
1.7 A QS gátlása illóolajokkal	11
1.8 A felhasznált illóolajok bemutatása	12
1.8.1 Boróka (<i>Juniperus communis</i>)	12
1.8.2 Citrom (<i>Citrus lemon</i>)	12
1.8.3 Majoránna (<i>Origanum majorana</i>)	12
1.8.4 Muskotályzsálya (<i>Salvia sclarea</i>)	12
1.9 A felhasznált mikroorganizmusok jellemzése	13
1.9.1 <i>Bacillus cereus</i>	13
1.9.2 <i>Chromobacterium violaceum</i>	13
1.9.3 <i>Pichia anomala</i>	13
II. Anyagok és módszerek	14
2.1 A felhasznált mikroorganizmusok	14
2.2 Táptalajok és oldatok	14
2.1.1 A biofilmek kialakításához felhasznált táptalajok és oldatok	14
2.1.2 A QS gátláshoz felhasznált táptalaj	15
2.3 Tenyésztési körülmények	15
2.4 A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása	15
2.5 Biofilm képzés követése illóolajok és komponenseikkel való kezelés következtében	16
2.5.1 A baktérium és élesztő biofilmek kialakítása és kezelése	16
2.5.2 Biofilmgátlás vizsgálata kristályibolyával való festés segítségével	16
2.6 QS gátlás mérése	17

2.7	Adatok statisztikai feldolgozása	17
III.	Eredmények és kiértékelésük	18
3.1	A biofilm képzés gátlásának a vizsgálata	18
3.1.1	Illóolajok és illóolaj komponensek hatása a <i>Bacillus cereus</i> által képzett biofilmekre	18
3.1.2	Illóolajok és illóolaj komponensek hatása a <i>Pichia anomala</i> által képzett biofilmekre	20
3.2	QS gátlás mérése.....	21
IV.	Következtetések	24
V.	Köszönetnyilvánítás	26
VI.	Felhasznált irodalom.....	27

Bevezető

Az utóbbi évek "zöld" mozgalmi és a vásárlók idegenkedése a mesterséges élelmiszer összetevőktől, a kutatók és az élelmiszeripar figyelmét természetes és környezetbarát anyagok felé fordította. A fertőzött élelmiszerek gondot jelentenek az egészségügy számára is, a súlyos, akut megbetegedések nagy százalékaért az ételmérgezések felelősek. A hagyományos tartósítószer nem csak a fogyasztók ellenőrzését váltja ki, de sokszor kellemetlen melléktermékek is keletkezhetnek a használatuk során. Mindezekből következően szükségessé vált új, természetes eredetű hatékony antimikrobiális szerek kifejlesztése, amelyek legalább részben, helyettesíthetik a szintetikus tartósítószereket.

A mikroorganizmusokkal szembeni védekezés esetében figyelembe kell venni azt is, hogy a legtöbb mikroorganizmus biofilmképző. A baktériumok ugyanazon okok miatt alakítanak ki biofilmnek nevezett közösségeket, mint minden más élő szervezet, például védelem a ragadozókkal és más kedvezőtlen tényezőkkel szemben, a tápanyagok jobb elérhetősége, genetikai diverzitás növelése (Johnson 2007). Ugyanakkor, összehasonlítva a planktonikus formákkal, ezek a közösségek fokozott rezisztenciát mutatnak különböző stresszhatásokkal, például antibiotikumokkal szemben és lehetővé teszik a baktériumok túlélését, szaporodását (Johnson 2007). Bizonyított tény, hogy a biofilmet alkotó baktériumok között létezik kommunikáció, amelyet elneveztek quorum sensing (QS) mechanizmusnak. Mivel a QS, a virulencia-faktorok szintézise, az extracelluláris poliszacharidok termelése és a mikrobiális biofilm képzése mellett, szabályozza a baktériumok patogenitását is, kihívást jelent a növényi kivonatok gátló (anti-quorum sensing) hatásának tesztelése erre a folyamatra.

Jelen dolgozat célja az, hogy kimutassa a citrom (*Citrus lemon*), boróka (*Juniperus communis*), majoránna (*Origanum majorana*) és muskotályzsálya (*Salvia sclarea*) illóolajoknak és főbb komponenseiknek (limonén, α -pinén, terpinén-4-ol, linalool) a biofilmek kialakulását gátló és anti-quorum sensing hatását.

A téma kiválasztását azzal indokolnám, hogy egyre nagyobb szükség van olyan antibakteriális anyagok használatára, amelyek nem vezetnek rezisztens törzsek kialakulásához, de ugyanakkor hatékonyan elpusztítják a sejteket és gátolják a további szaporodást illetve a biofilmek kialakulását. A QS mechanizmus szabályozásával a mikroorganizmusok patogenitása is szabályozhatóvá válhat, tehát a QS inhibitorok kétségtelenül segítenének a mikrobiális fertőzések fékezésében és kezelésében.

I. Szakirodalmi áttekintés

1.1 A biofilmek általános jellemzése

Manapság rendkívül sokat foglalkoznak a biofilmek tanulmányozásával, nemcsak azért mert komplex struktúrákról van szó, hanem mert fokozott ellenállóképességük révén rengeteg kárt is okozhatnak.

Pontos meghatározás szerint a biofilm különböző mikroorganizmusok önszerveződő közössége, amelyek különféle felületekhez tapadva egybefüggő bevonatot, biohártyát képeznek és ilyen formában sokkal ellenállóbbak a kedvezőtlen körülményekkel szemben (Prakash és mtsai 2003). Anton van Leeuwenhoek volt az első, aki a fogáról lekapart lepedéket vizsgálva, primitív mikroszkópjával biofilmet figyelt meg (Costerton és mtsai 1999). Az 1980-1990-es években fellendültek a mikrobiológia ezen érdekes területével kapcsolatos kutatások és napjainkban is folyamatosan új információkkal gazdagodunk.

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

A biofilm kialakulása során négy szakaszt különíthetünk el, a letapadást, mikrokolóniák kialakulását, háromdimenziós struktúrák és a fejlett forma kialakulását és leválást. A ma ismert számos mikroorganizmus közül csak néhányan rendelkeznek biofilmet képző tulajdonsággal. Ez annak köszönhető, hogy csak bizonyos fajokban figyelhető meg *sad* gén, melynek létezését *Pseudomonas aeruginosa* baktériummal végzett kísérletek során bizonyították.

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 és mtsai 2006).

1.2 A quorum sensing (QS) mechanizmus bemutatása

A biofilmet alkotó baktériumok között létezik kommunikáció. Ennek a sejtsűrűség-függő kommunikációnak segítségével a sejtek értesülnek egymás állapotáról, a közösség számbeli nagyságáról, illetve a környezeti tényezők hatására koordinálják életműködéseiket (Wagner és mtsai 2003). A baktérium sejtek autóindukáló jelmolekulákat (feromont) termelnek és bocsátanak ki a környezetükbe, amelyek segítségével érzékelik a populáció denzitását (Wang és mtsai 2007). Amikor ezek az anyagok elérnek egy kritikus küszöbértéket, kapcsolódnak a regulátor fehérjékhez, ezáltal indukálva vagy gátolva bizonyos gének expresszióját (Wagner és mtsai 2003; Wang és mtsai 2007). Ezt a sejt-sejt kommunikációs rendszert nevezték el **quorum sensing** (QS) szabályozási mechanizmusnak, ez végbemehet fajon belül, illetve különböző fajok egyedei között is. A quorum az a minimális tömeg, ahol fellép a jelenség, a sensing a környezetből érkező jelek észlelésére utal.

Ezt a viselkedésformát először a *Vibrio fischeri* nevű baktériumnál figyelték meg, ahol ez a mechanizmus a biolumineszcenciáért felelős géneke expresszióját szabályozza (Wagner és mtsai 2003). A mechanizmus megtalálható mind Gram negatív mind Gram pozitív mikroorganizmusoknál és kapcsolatban áll a sejtek viselkedésével, illetve a kórokozóknál meghatározza ezek virulenciáját is (Wagner és mtsai 2003). A két baktériumcsoport quorum sensing rendszerei alapvetően különböznek egymástól, elsősorban a szignálmolekulák természetét illetően. A Gram negatív baktériumoknál a quorum sensing rendszerek szignálmolekulája az N-acil-homoszerin-laktonok (AHL) családjába tartozik, a Gram pozitív baktériumok esetében pedig ezek egy szenzor-kináz/regulátor kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszert használnak ahol a jelmolekulák szerepét kis molekulatömegű oligopeptidok töltik be (Papp 2009). Mindkét csoportnál számos folyamat a quorum sensing rendszerek szabályozása alatt áll, ilyen a már említett bakteriális fénytermelés (biolumineszcencia), a virulencia-faktorok szintézise, az extracelluláris poliszacharidok termelése és a mikrobiális biofilm képzése, másodlagos anyagcseretermékek termelése, kemotaxis, konjugáció (Papp 2009).

Jelenlegi kutatások szerint, a QS működésének szabályozása laboratóriumi körülmények között nagy áttörést jelentene a mikrobiológiában, ugyanis ezáltal lehetővé válna a biofilm okozta fertőzések szabályozása, kivédése állatoknál és a növényeknél egyaránt (Wang és mtsai 2007).

1.3 Mikroorganizmusok az élelmiszeriparban

Az élelmiszergyártásban komoly kihívást jelentenek az élelmiszerrontó 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 salátán, almalében előforduló *Escherichia coli*, a málnán levő *Cyclospora cayetanensis*, illetve a paradicsomon levő *Salmonella* okozott leggyakrabban ételmérgezést az USA-ban. Rendkívül fontos tehát ezen mikroorganizmusok túlélési stratégiáinak a megértése ahhoz, hogy csökkenthető legyen a fertőzések száma.

Az élelmiszergyárakban levő gépek felületén és a belső részekben számos mikroorganizmus fordul elő akár planktonikus vagy biofilm formájában és így a végtermék, amely a fogyasztóhoz kerül, könnyen befertőződhet. Főleg olyan környezetben, ahol az élelmiszerek csomagolása vagy elkészítése zajlik, a nedvességnek és tápanyagok jelenlétének köszönhetően nagyobb valószínűséggel jelennek meg mikroorganizmusok, mint máshol. Nemcsak a gyárakban, hanem a háztartási kellékeken, például mosogatószivacson, vágódeszkán, edénytörlőn is számos törzs letapadhat és biofilmet képezhet (Reyner és mtsai 2004).

Felmérések azt mutatják, hogy a fogyasztókat sokkal jobban foglalkoztatja az élelmiszerek mikrobiológiai tisztasága, mint az, hogy mennyi peszticid vagy antibiotikum marad vissza a különböző kezelések következtében. Az utóbbi években, főleg olyan anyagokra fektették a hangsúlyt, amelyek hatékonyan eltávolítják a biofilmeket a felületekről így megelőzve az élelmiszerek károsodását. A szintetikus anyagok azonban ellenérzetet váltottak ki a fogyasztók körében, így más irányba indultak el a kutatások. Az újabb, hatékonyabb fertőtlenítők keresése ma már egy teljesen új kutatási területnek számít. Az elmúlt években a fűszernövények, aroma- és gyógynövények illóolajaira terelődött a figyelem, ugyanis régóta használják őket az élelmiszeriparban aromaanyagokként. A kutatók abból a tényből indultak ki, hogy mivel a növények egy magas bakteriális denzitású környezetben élnek, védekező mechanizmusokkal kell rendelkezniük a fertőzésekkel szemben (Song és mtsai 2010). Így elkezdődött az olyan növényi anyagok tanulmányozása, amelyek nem toxikusak, de képesek gátolni a sejtek szaporodását (Hentzer és mtsai 2003).

1.4 Az illóolajok általános jellemzése

Az illóolajok, a levegőn könnyen elpárolgó, aromás, tömény hidrofób folyadékok, melyeket leggyakrabban vízgőz- desztillációval nyernek a különböző növényi részekből

(virágokból, gyümölcsökből, magvakból, virágbimbókból, levelekből, kéregből). Régóta használják őket a kozmetikai iparban és mostanában egyre nagyobb szerepet kapnak az élelmiszeriparban is, ahol főleg íz-és aromaanyagként használják őket. Az is ismert, hogy bizonyos illóolajok rendelkeznek baktérium-, gomba-, vírus- és parazitaellenes hatással, ezért gyógyszerkészítményekben is előfordulnak.¹

Már az ókorban ismerték az illóolajok jótékony hatásait és ki is használták ezeket. Például az egyiptomiak a halottak balzsamozásához felhasználták az illóolajok baktériumölő és konzerváló hatását, a kínai kultúrában többféle aromás növényt használtak, és már az egyiptomiak előtt alkalmazták a fahéjat, borsot és gyömbért járványok ellen (Bakkali és mtsai 2008).

Az illóolajok számos komponensből állnak, ezek lehetnek fő és minor komponensek, az utóbbiak egyes esetekben csupán nyomokban fordulnak elő. A komponensek általában terpének és terpenoidok, mono- vagy szeszkviterpének, illetve di- és triterpének lehetnek. A terpének kívül további jelentős összetevők lehetnek a különböző alacsony molekulatömegű alifás és aromás vegyületek, például szénhidrogének, savak, alkoholok, aldehidek, laktonok és kéntartalmú illékony vegyületek (Bakkali és mtsai 2008).

1.5 Az illóolajok antimikrobiális hatása

A növényi illóolajok antimikrobiális hatásának vizsgálata számos kutatás alapját képezi, ugyanis 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).

Az illóolajok antibakteriális hatását számtalan humánpatogén (pl. *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* stb.), élelmiszer eredetű megbetegedést okozó (pl. *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Clostridium botulinum* stb.) és élelmiszerromlást okozó (pl. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Serratia marcescens* stb.) baktériumok ellen vizsgálták már (Ahmed és Beg 2000, Bagamboula és mtsai 2004, Niu és Gilbert 2004, Gutierrez és mtsai 2009, Rahman és Kang 2009, Angienda és mtsai 2010). Általános megfigyelés, hogy a Gram pozitív baktériumok érzékenyebbek az illóolajok gátló hatására, mint a Gram negatívak. A különbség valószínűleg az eltérő sejtfalszerkezetnek, illetve a Gram negatív baktériumsejtfal külső membránjának köszönhető, mely gátat jelenthet a hidrofób illóolaj komponensek számára (Burt 2004). Mivel az illóolajok számos összetevőből állnak, hatásukat is különböző formában fejtik ki. A

¹ <http://hu.wikipedia.org/wiki/Ill%C3%B3olaj>

leggyakoribb célpont a sejtfal és a sejthártya. A hidrofób komponensek beékelődhetnek a sejthártyába, megnövelve ennek átjárhatóságát, ami a sejtplazmában található anyagok kiáramlásához, illetve a sejtplazma fehérjék kicsapódását okozó illóolaj komponensek beáramlásához vezet (Burt 2004). A gombák esetében hasonló a hatás, itt is a sejthártya és sejtfal a célpont.

1.6 Az illóolajok hatása a biofilmek kialakulására

A biofilmek olyan bakteriális vagy gomba sejtek populációi, amelyek funkcionálisan függenek egymástól, így olyan aktivitások megvalósítása is lehetségessé válik, amelyek egyedülálló sejtek esetében nem kivitelezhetők (Meng-Ying és mtsai 2009). Összehasonlítva a planktonikus formákkal, ezek a közösségek fokozott rezisztenciát mutatnak antibiotikumokkal, fertőtlenítőkkel, különböző stressz hatásokkal szemben és lehetővé teszik a baktériumok túlélését, szaporodását (Johnson 2007). Ugyanakkor, mivel a sejtek nagyon közel vannak egymáshoz, a horizontális géntranszfer nagyon gyakori. Így a plazmidcsere következtében, a rezisztencia egy bizonyos antibiotikummal, tisztítószerrel szemben átadható a többi sejtnak is (Trachoo 2003).

A bakteriális fertőzések legalább 80%-a a biofilmek kialakulásának köszönhető és az antibiotikumokkal szembeni fokozott rezisztencia egyre nehezebbé teszi ezek gyógykezelését (Wang és mtsai 2007). Az antibiotikus kezelések enyhítik a biofilmet alkotó sejtek által okozott fertőzések tüneteit, viszont magát a biofilmet nem képesek elpusztítani, ezért a fertőzések újra megjelennek egy adott kezelési ciklus után mindaddig, míg sebészeti úton el nem távolítják az egész populációt (Khoury és mtsai 1992, Prakash és mtsai 2003).

Az élelmiszeriparban egyre nagyobb az igény arra, hogy az élelmiszerek hosszú ideig eltarthatók legyenek károsodás nélkül. A letapadt sejtek eltávolítása a gyümölcsökről és zöldségekről igen körülményesnek bizonyult a hidrofób kutikula, változó felületi morfológia és az epidermiszen lévő sérülések és szabálytalanságok miatt (Ramey és mtsai 2004).

Számos kutatásban vizsgálták a baktériumok, ami a letapadást illeti. Burnett és mtsai egy 2000-es kutatásukban az *Escherichia coli* O157:H7 letapadását vizsgálták almák (*Malus domestica*) felületén és azt tapasztalták, hogy a baktériumok képesek voltak hatékonyan behatolni akár a belső szövetekig és károsítani azokat. A kutikula szabálytalan felülete kedvezett a letapadási folyamatnak. Ezt az eredményt alátámasztja egy másik kutatás is, ahol ugyanazt a fajt használták és megfigyelték, hogy a baktériumok a jégсалáta (*Lactuca sp.*) levágott végeihez tapadtak a legszívesebben (Takeuchi és Frank 2000). Különböző fajok más-

más letapadási és biofilmképző képességekkel rendelkeznek és a felület milyensége is jelentősen befolyásolja ezeket a folyamatokat.

Az élelmiszerek eltarthatóságának javítására többféle eljárás is létezik, azonban a friss, minimálisan feldolgozott élelmiszerek iránti növekvő igény és a fogyasztók ellenérzése a szintetikus tartósítószerrel szemben, a figyelem középpontjába állította a természetes eredetű, környezetbarát antimikrobiális hatóanyagokat. A terpenoid és fenol (timol, karvakol, eugenol) összetevők felelősek az illóolajok antibakteriális hatásaiért. A leggyakrabban alkalmazott kivonási technika a vízgőz- desztilláció, de más eljárásokkal is ki tudják vonni az illóolajokat a növényekből. Kutatások azt mutatják, hogy ezek az eljárások befolyásolhatják az olajok kémiai összetételét, így az antibakteriális hatást is (Angienda és mtsai 2010). Fontos megjegyezni, hogy ugyanannak a hatásnak az eléréséhez az *in vitro* kísérletekben általában alacsonyabb illóolaj koncentrációra van szükség, mint az élelmiszerben, mivel az élelmiszerekben jelen lévő összetett kémiai környezet gátat jelenthet az illóolaj antimikrobiális hatásával szemben. Az élelmiszerekbe magasabb koncentrációban adagolt illóolajok ugyanakkor negatívan befolyásolhatják az élelmiszer érzékszervi tulajdonságait (ízét, illatát, zamatát) (Burt 2004).

A magas fehérje-, zsír-, illetve olajtartalom 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).

Számos kutatásban igazolták az illóolajok és komponenseik biofilm képzést gátló hatását. Egy 2009-ben végzett kísérletben az eukaliptusz-olaj és fő komponensének, az 1,8-cineol-nak a hatását vizsgálták biofilmekre és planktonikus formákra is. Gram pozitív, Gram negatív baktériumokat és gombákat is használtak a kutatásban. Az antibakteriális hatás mellett, sikerült igazolni az olaj és komponensének biofilm képzést gátló hatását is. Ugyanakkor, keverték az olajokat klórhexidin-diglukonát szintetikus fertőtlenítőszerrel, amelynek egyik hátránya az, hogy gyengén hatol át a biofilmeket körülvevő poliszacharid mátrixon. Sikerült kimutatni, hogy az olajok és a fertőtlenítőszer között szinergizmus alakult ki, tehát fokozták egymás hatékonyságát, ami a biofilm képzés gátlását és az antimikrobiális hatást illeti (Hendry és mtsai 2009).

1.7 A QS gátlása illóolajokkal

A gyógyszerek tanulmányozása során a növényi kivonatok esetében inkább az antimikrobiális hatást figyelték, a sejtek növekedésének gátlása vagy az elpusztítása volt a fő cél, figyelmen kívül hagyva ezen anyagok QS gátló hatását (Wallace 2004, Al Hussaini és Mahasneh 2009). A patogén mikroorganizmusok egyre magasabb rezisztenciája a számos mutációnak, az antibiotikumok nem megfelelő használatának és számos más faktornak köszönhető (Adonizio és mtsai 2006, Annous és mtsai 2009). Ilyen helyzetekben a hagyományos kezelések a kórokozó növekedésének gátlása fele irányulnak, viszont legtöbbször ez már nem elég (Lewis 2001, Spoering és Lewis 2001). Feltételezések szerint a QS mechanizmus arra is alkalmas, hogy lecsökkentse vagy teljesen gátolja a gazdaszervezet immunválaszát ameddig a kialakuló biofilm közösség el nem ér egy bizonyos sejtszámot (Lynch 2003). Tehát logikusnak tűnik az a következtetés, hogy a QS mechanizmus szabályozásával a mikroorganizmusok patogenitása is szabályozható.

Az első QS inhibitorokat a *Delisea pulchra* vörös algából izolálták és legújabban számos szárazföldi növény esetében is vontak ki hasonló anyagokat. Adonizio és mtsai egy 2006-ben végzett kutatásban ötven floridai gyógynövény illóolájának QS gátló hatását tesztelték *Chromobacterium violaceum* és *Agrobacterium tumefaciens* modellbaktériumokon. Papírkorong diffúziós módszer segítségével a színtelen zónákat mérték ugyanis a baktériumok színanyagtermelése QS szabályozás alatt áll. Fontos megemlíteni azt is, hogy az illóolajok antibakteriális és anti-QS hatása között különbségek vannak. Ha antibakteriális hatásról beszélünk, a keletkező gátlási zónák tiszták, sejtmentesek. Anti-QS hatás esetében ezekben a zónákban a sejtnövekedés normális, a színtelen zóna a pigmentanyag képződés gátlásának köszönhető. A kísérletben hat növény esetében sikerült kimutatni az anti-QS hatást. Egy 2010-es kutatásban a ginzeng (*Panax ginseng*) QS gátló hatását vizsgálták *Pseudomonas aeruginosa* esetében. Korábbi kutatások már kimutatták, hogy a *Pseudomonas* egy oportunista patogén mikroorganizmus, amely rendelkezik QS mechanizmussal. A kutatás során sikerült igazolni, hogy a növény illóolaja hatékonyan csökkentette a patogenitást (Song és mtsai 2010).

A quorum sensing inhibitorok kétségtelenül segítenének a mikrobiális fertőzések fékezésében és kezelésében, ugyanakkor csökkenne annak a valószínűsége, hogy a mikroorganizmusok rezisztenciát alakítsanak ki a hatóanyagok ellen (Al Hussaini és Mahasneh 2009, Song és mtsai 2010). Emiatt, elkezdődött az olyan növényi anyagok keresése és tanulmányozása, amelyek nem adnak lehetőséget arra, hogy új, rezisztens törzsek alakuljanak ki, viszont képesek gátolni a bakteriális kommunikációt (Hentzer 2003).

1.8 A felhasznált illóolajok bemutatása (Aromax Kft., Magyarország)

1.8.1 Boróka (*Juniperus communis*)

Az olajat a növény érett tobozbogyóiból vízgőz-desztillációval állítják elő. Főbb komponensei: **α -pinén** (29,17%), **β -pinén** (17,84%), szabinén (13,55%), limonén (5,52%) és mircén (0,33%) (Pepeljnjak és mtsai 2005). Az α -pinén kettős gyűrűs szerkezetű, leginkább a vese kiválasztó működésének fokozásában van szerepe, de jótékony, erősítő, tisztító hatású légzőszervi megbetegedések esetén is. A boróka illóolaj antibakteriális hatását több Gram pozitív és Gram negatív baktérium (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*) valamint élesztőgombák (*C. albicans*, *C. krusei*, *H. anomala*) és bőrgombák (*Trichophyton rubrum*, *Microspora canis* stb.) ellen vizsgálták (Pepeljnjak és mtsai 2005).

1.8.2 Citrom (*Citrus lemon*)

A citrom illóolaját a gyümölcshéjból hideg préseléssel állítják elő. Átlátszó, halványsárga vagy zöldessárga színű, erősen citrus illatú olaj. Fő komponense a **limonén** (59%) és a **β -pinén** (16%). A limonén ciklikus, egyszerű szénhidrogén, nyugtató, frissítő, hangulatjavító hatású. Használják kozmetikumokban és az élelmiszeriparban egyaránt. Az olaj hatékonyabbnak bizonyult a Gram pozitív baktériumok ellen, mint a Gram negatívakkal szemben (Gupta és mtsai 2008).

1.8.3 Majoránna (*Origanum majorana*)

A majoránna az árvacsalánfélék (Lamiaceae) családjába tartozó növényfaj. Eredeti hazája a Földközi-tenger környéke, de ma már nagyüzemi módon és kiskertekben egyaránt termesztik. A növény szárított, morzsolt levele és virágzata a fűszer. Felhasználható levesek, főzelékek, mártások, húsételek, borok ízesítésére. Teáját fejfájás, köhögés, légzési zavarok enyhítésére használják, olajával a reumás testrészeket dörzsölik be. A legmagasabb mennyiségben **terpinén-4-olt** (30%) tartalmaz, amely alkoholos vegyület (Gupta és mtsai 2008).

1.8.4 Muskotályzsálya (*Salvia sclarea*)

A muskotályzsálya ugyancsak az árvacsalánfélék (Lamiaceae) családjába tartozó növényfaj. Dél-Európából származik, az illóolaja és egyéb összetevői miatt már világszerte termesztik. A fő komponensei a linalil acetát (51%) és **linalool** (27%), ez utóbbi alkoholos

vegyület. Alkalmazása depresszió, klimax, stressz, korpásodás, menstruációs zavarok, magas vérnyomás esetén javasolt.²

Látható, hogy a boróka és a citrom olaja elsősorban egyszerű monoterpéneket tartalmaz főkomponensként, míg a majoránna terpén-alkoholokat és monoterpéneket, a muskotályzsálya pedig egy terpén-alkoholt (linalool) és annak acetátos formáját tartalmazza. A különböző összetevők különböző tulajdonságokkal rendelkeznek és más lehet a hatásuk is. Általánosan elfogadott tény, hogy a legerősebb antimikrobiális hatással a fenolos jellegű összetevők, mint a karvakrol és timol rendelkeznek (Dorman és Deans 2000). A jelen kísérletben használt illóolajokban nincsenek ilyen jellegű vegyületek.

1.9 A felhasznált mikroorganizmusok jellemzése

1.9.1 *Bacillus cereus*

A *Bacillus cereus* a *Firmicutes* törzsbe tartozó *Bacillus* nemzetség egyik leggyakoribb faja. Endospórát képző, pálcika formájú, Gram pozitív baktérium. Fakultatív anaerob, talajban, levegőben egyaránt előfordul. Egyes ételekben (rizs, húsfélék, tojás, burgonya) elszaporodva enterotoxinja emésztőszervi panaszokat, láz nélküli hasmenéssel és hányással járó ételmérgezést okozhat.³

1.9.2 *Chromobacterium violaceum*

A baktérium a *Neisseriaceae* családba tartozik, Gram negatív, fakultatív anaerob és általában a trópusi és szubtrópusi régiók vizeinek és talajának normál flóráját alkotja. A violacein pigment termelése miatt, a kolóniák sötétlila színűek. A violacein ugyanakkor egy természetes antibiotikum is, amely hasznos lehet különböző ráktípusok kezelésében. Ritkán fertőzi meg az embert, de egyes esetekben okozhat szepszist vagy májgyulladást. A violacein termelése QS szabályozás alatt áll, ezért számos anti-QS hatást vizsgáló kutatásban használják modellszervezetként.⁴

1.9.3 *Pichia anomala*

A *Pichia* (*Hansenula* és *Hyphopichia*) nemzetség a *Saccharomycetaceae* családba (élesztőgombafélék) tartozik. A *P. anomala* az egyik legérdekesebb faja a nemzetségnek, széles körben elterjedt. Izolálták már ételekből, rovarokból, szennyvízből, emberi szövetből ezért egyre több kutatásban használják fel modellszervezetként (Walker 2011). Gyümölcs- és

² <http://blog.xfree.hu/myblog.tvn?SID=&pev=2010&pho=2&n=pacsakute>

³ http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_cereus

⁴ http://en.wikipedia.org/wiki/Chromobacterium_violaceum

zöltség eredetű élelmiszerekben erjedéssé romlást okoz. Folyadékok felületén hártaképzésre hajlamos.

II. Anyagok és módszerek

2.1 A felhasznált mikroorganizmusok

A kísérlet során két prokariótát használtunk fel, ezek a *Bacillus cereus* (Gram pozitív) és *Chromobacterium violaceum* (Gram negatív) illetve egy eukarióta szervezetet, a *Pichia anomala* élesztőt. A *B. cereus*-t és *P. anomala*-t a biofilm képzéshez és a *C. violaceum* baktériumot pedig az anti-QS vizsgálatokhoz alkalmaztuk.

2.2 Táptalajok és oldatok

2.1.1 A biofilmek kialakításához felhasznált táptalajok és oldatok

Kiegészített hústáptalaj (MEE):	4 g húskivonat
	4 g pepton
	10 g glükóz
	1 g élesztőkivonat
	1000 ml desztillált víz
	15 g agar

Malátás táptalaj (MEA):	50 ml maláta kivonat
	5 g élesztőkivonat
	5 g glükóz
	1000 ml desztillált víz
	15 g agar

Fiziológiás sóoldat:	9 g NaCl
	1000 ml desztillált víz

2.1.2 A QS gátláshoz felhasznált táptalaj

Chromobacterium violaceum

táptalaj:	1 g élesztőkivonat
	10 g NaCl
	1 g K ₂ HPO ₄
	0.3 MgSO ₄ +7H ₂ O
	36 mg Na EDTA
	10 mg Fe III ammónium citrát
	10 g tripton
	1000 ml desztillált víz
	15 g agar

2.3 Tenyésztési körülmények

A kiegészített hústáptalajt a *B. cereus* esetében, a malátás táptalajt pedig a *P. anomala* élesztőnél alkalmaztuk és 30°C hőmérsékleten 24 óráig inkubáltuk a leoltott tenyészeteket.

A *C. violaceum* típusörzset Petri csészékben levő, megfelelő táptalajra oltottuk le 10⁷/ml sejtszámú szuszpenziójából és szobahőmérsékleten (laboratóriumi munkaasztalon) hagytuk felnőni a telepeket. 72 órás tenyészeteket használtunk.

2.4 A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása

A MIC érték az a legkisebb illóolaj vagy komponens koncentráció, amely megakadályozza az adott mikroorganizmus szaporodását. Az illóolajok és komponenseik ezen értékeinek meghatározása esetében a törzseket a 2.2 pontban leírt tápközegekben és hőmérsékleten inkubáltuk 96 cellás polisztirol mikrotiter lemezekben.

A *P. anomala* esetében az olajokra már meg volt határozva a MIC (Tserennadmid 2010), a komponensek esetében a keresés 0.5 µl/ml-től változott 8 µl/ml-es koncentrációig. Az olajos oldatokhoz 1%-os TWEEN 40-et adtunk, erre azért volt szükség, hogy az olajok keveredése a tápoldatban minél hatékonyabb legyen. A mikroorganizmusok tápoldattal elkészített 10⁵/ml sejtszámú szuszpenziójából 100 µl-t adtunk az olajos tápközegekhez, majd a tenyészeteket 24 órán át inkubáltuk. A fotometriás mérést (A580) követően az eredeti értéktől való 5%-os csökkenés számított MIC értéknek (DU[®]-65 Spektrofotométer, Beckman; ASYS Jupiter HD mikrotiterlap olvasó, ASYS Hitech). Az illóolaj vagy illóolaj komponens,

illetve szuszpenzió nélküli tápoldat (háttér) optikai denzitás értékét minden esetben kivontuk a kapott eredményből. A keresést minden olaj és komponens esetében három párhuzamos méréssel végeztük.

A *B. cereus* esetében a MIC értékeket korábbi kutatásokban már meghatározták az olajokra és a komponensekre is (Tserennadmid 2010).

2.5 Biofilm képzés követése illóolajok és komponenseikkel való kezelés következtében

2.5.1 A baktérium és élesztő biofilmek kialakítása és kezelése

A biofilmeket 96 cellás mikrotiter lemezekben alakítottuk ki. Egy cellába $200\ \mu\text{l}$ $10^8/\text{ml}$ sejtszámú sejtsuszpenziót adtunk és 4 órán keresztül inkubáltuk a lemezeket 30°C hőmérsékleten. Ezután, a le nem tapadt sejteket kimostuk fiziológiás sóoldattal és hozzáadtuk az elkészített illóolaj/illóolaj komponens oldatokat amelyek MIC/2 koncentrációban voltak. Ebben az esetben is az olajos oldatokhoz 1%-os TWEEN 40-et adtunk. 24 órás inkubáció következett 30°C hőmérsékleten. Inkubáció után az illóolajos oldatokat letöltöttük vagy pipettával kiszippantottuk és a cellákat átöblítettük fiziológiás sóoldattal. Kristályibolyás festést alkalmaztunk a kezelés hatásának megállapításához. Az illóolajokat nem tartalmazó sejtsuszpenziós tápoldat szolgált pozitív kontrollként. A kezeléseket, minden az olajok és komponensek esetében hat párhuzamos méréssel végeztük.

2.5.2 Biofilmgátlás vizsgálata kristályibolyával való festés segítségével

A kezeléssel való 24 órás inkubációt követően, a le nem tapadt sejteket leszívtuk majd fiziológiás sóoldattal átöblítettük a mikrotiter lapokat. Ezután mindegyik lyukba $200\ \mu\text{l}$ 99%-os metanolt mértünk, hogy rögzítsük a sejteket. 15 perc várakozás után a felülúszót leöblítettük majd megszáritottuk a lemezeket. Ezután $200\ \mu\text{l}$ 0.1 %-os kristályibolya oldatot adtunk a lyukakba. 20 perc múlva a felesleges festéket csapvíz alatt leöblítettük. Végül, a biofilmekhez kötődött festéket $150\ \mu\text{l}$ 33%-os ecetsavval oldottuk fel és 590 nm-en abszorbanciát mértünk (ASYS Jupiter HD (ASYS Hitech) mikrotiterlap olvasó). A kristályibolya kapcsolódik a negatív töltésű felületi molekulákhoz és poliszacharidokhoz a biofilmek extracelluláris mátrixán belül és lehetővé teszi a biofilm teljes biomasszájának becslését a mikrotiter lap celláján belül (Peeters és mtsai 2008). Ebben az esetben is az illóolaj vagy illóolaj komponens, illetve szuszpenzió nélküli tápoldat (háttér) optikai denzitás értékét minden esetben kivontuk a kapott eredményből.

2.6 QS gátlás mérése

A QS gátlás méréséhez a papírkorong diffúziós módszert alkalmaztuk. Előzőleg *Chromobacterium violaceum*-al leoltott és beszárított Petri csészékre 6-8 mm átmérőjű steril szűrőpapír korongokat tettünk. Ezekre a korongokra 1-3 μ l illóolajat vagy komponenst vittünk fel. Desztillált vízzel átitatott papírkorong szolgált kontrollként. A depigmentáltság okozta színtelen zónákat mértük (mm), ugyanis a baktérium színanyag termelése QS szabályozás alatt áll. A kezeléseket, minden az olajok és komponensek esetében három párhuzamos méréssel végeztük és fotókat készítettünk a látómezőkről.

2.7 Adatok statisztikai feldolgozása

Minden elemzést az R statisztikai programcsomagban (R 2.8.1) végeztünk el, egy utas ANOVA-t és Tukey HSD teszteket használva, $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett.

III. Eredmények és kiértékelésük

3.1 A biofilm képzés gátlásának a vizsgálata

Az adatok normalitását az R Works programban a Shapiro-Wilk teszt segítségével vizsgáltuk. A kapott p értékek nagyobb volt a 0,05-ös küszöbértéknél, tehát az adatokat normál eloszlásúaknak tekintettük. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az illóolajokkal és komponensekkel való kezelések, hogyan befolyásolták a mikroorganizmusok biofilm képzését, ezért egy utas ANOVA-t használtunk. Ahhoz, hogy kiderítsük, melyik kezelés hatása tért el szignifikánsan a kontroll csoporttól illetve melyik kezelések között volt szignifikáns eltérés, a TukeyHSD tesztet alkalmaztuk.

3.1.1 Illóolajok és illóolaj komponensek hatása a *Bacillus cereus* által képzett biofilmekre

Az illóolajok és fő komponenseik *B.cereus* esetébe megállapított minimális gátló koncentráció (MIC) értékeket az 1. táblázat tartalmazza. A kísérlet során MIC/2 koncentrációt használtunk a biofilmek kezelésére, ugyanis nem a szaporodás, hanem a biofilm képzés gátlása volt a cél.

1. táblázat

Illóolajok és komponensek	MIC érték (µl/ml)
Citrom	1
Boróka	1
Majoránna	0,25
Muskotályzsálya	0,5
Limonén	4
α-pinén	6
Terpinén-4-ol	6
Linalool	6

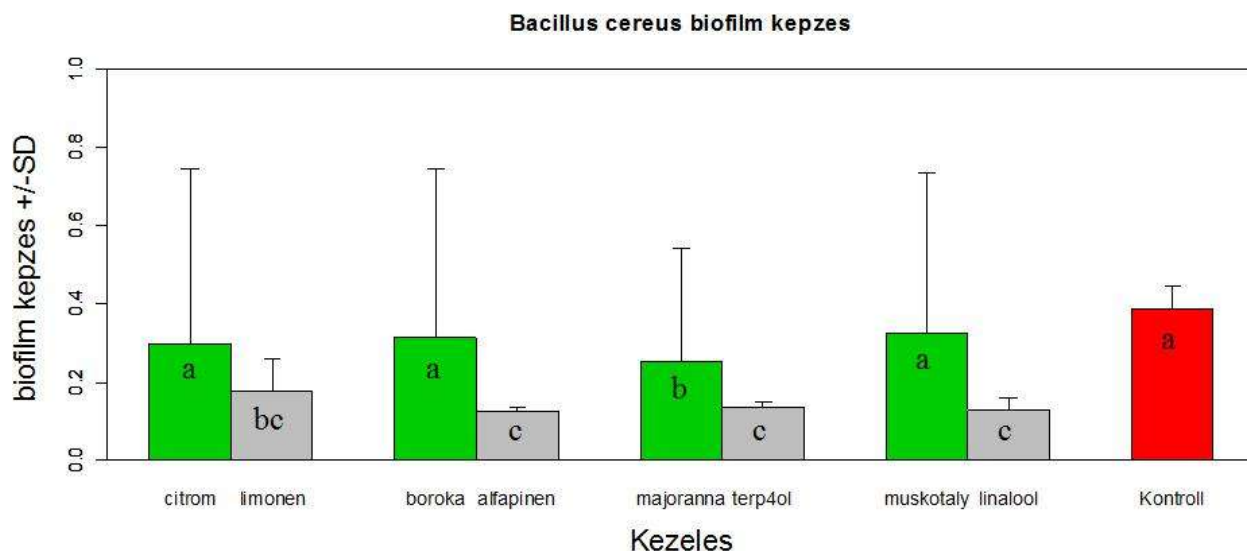
Az ANOVA teszt kimutatta, hogy a kezelések között szignifikáns eltérések vannak ($p=0.0003$) illetve a kezelések hatása is szignifikáns a felhasznált mikroorganizmusok esetében ($p=0.0168$). Tehát a felhasznált illóolajok és komponenseik csökkentették a biofilmképzést egyes esetekben illetve a kezelés hatása függött a felhasznált illóolajtól. A

TukeyHSD tesztet alkalmazva, a *B. cereus* esetében sikerült szignifikáns eltéréseket kimutatni a kezelések és a kontroll csoport között illetve a különböző kezelések között is (2. táblázat).

2. táblázat

Illóolaj/illóolaj komponens	p érték
citrom-limonén	0.0065
citrom-linalool	<0.001
citrom-terpinén-4-ol	<0.001
citrom- α -pinén	<0.001
boróka- α -pinén	<0.001
boróka-limonén	0.0014
boróka-linalool	<0.001
boróka-terpinén-4-ol	<0.001
majoránna- kontroll	0.010
majoránna- α -pinén	0.0032
majoránna-linalool	0.0046
majoránna-terpinén-4-ol	0.0124
muskotályzsálya- α -pinén	<0.001
muskotályzsálya-limonén	<0.001
muskotályzsálya-linalool	<0.001
muskotályzsálya-terpinén-4-ol	<0.001
kontroll-limonén	<0.001
kontroll- α -pinén	<0.001
kontroll- terpinén-4-ol	<0.001
kontroll-linalool	<0.001

Az 1. ábra és 2. táblázat alapján elmondható, hogy az olajok nem mutattak szignifikáns eltérést sem a kontroll csoporttól sem egymástól, kivéve a majoránnát, amely eltért a kontrolltól. Az illóolaj komponensek hatásosabbak voltak, mint az olajok ugyanis szignifikáns eltérést mutattak a többi olajtól illetve a kontrolltól is. Az összes komponens különbözik a kontrolltól és az illóolajoktól, de nem különböznek egymástól. A limonén azonban nem különbözik a majoránnától sem. Az 1. ábrán a szignifikáns eltéréseket különböző, a nem szignifikáns eltéréseket pedig azonos betűkkel jelöltük.



1.ábra Illóolajok és illóolaj komponensek hatása a *Bacillus cereus* biofilmképzésére

3.1.2 Illóolajok és illóolaj komponensek hatása a *Pichia anomala* által képzett biofilmekre

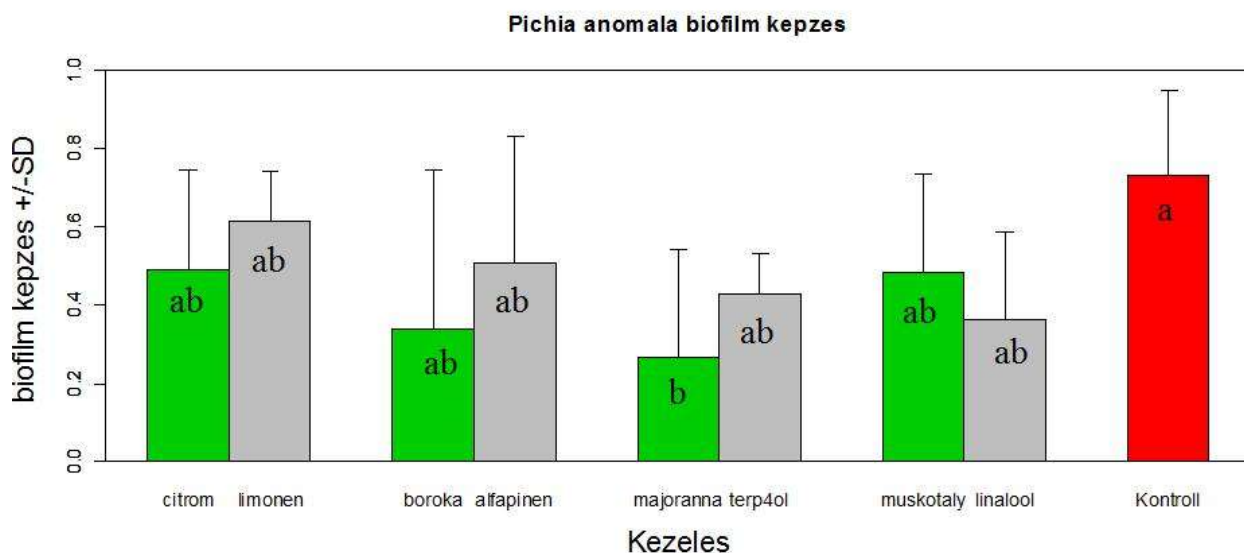
A *P. anomala* élesztő esetében a komponensekre való MIC értékeket a jelen kísérletben találtuk meg és az összes értéket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat

Illóolajok és komponensek	MIC érték (μl/ml)
Citrom	0,75
Boróka	0,5
Majoránna	0,5
Muskotályzsálya	1
Limonén	1
α-pinén	1
Terpinén-4-ol	1
Linalool	1

Összehasonlítva a kezeletlen mintákat a kezeltekkel, szignifikáns eltérést találtunk a kontroll csoport és a majoránna esetében ($p=0.029$), a többi olaj és komponensnél viszont nem (2. ábra). Az 2.ábra alapján elmondható, hogy a citrom és boróka olajok jobb biofilm

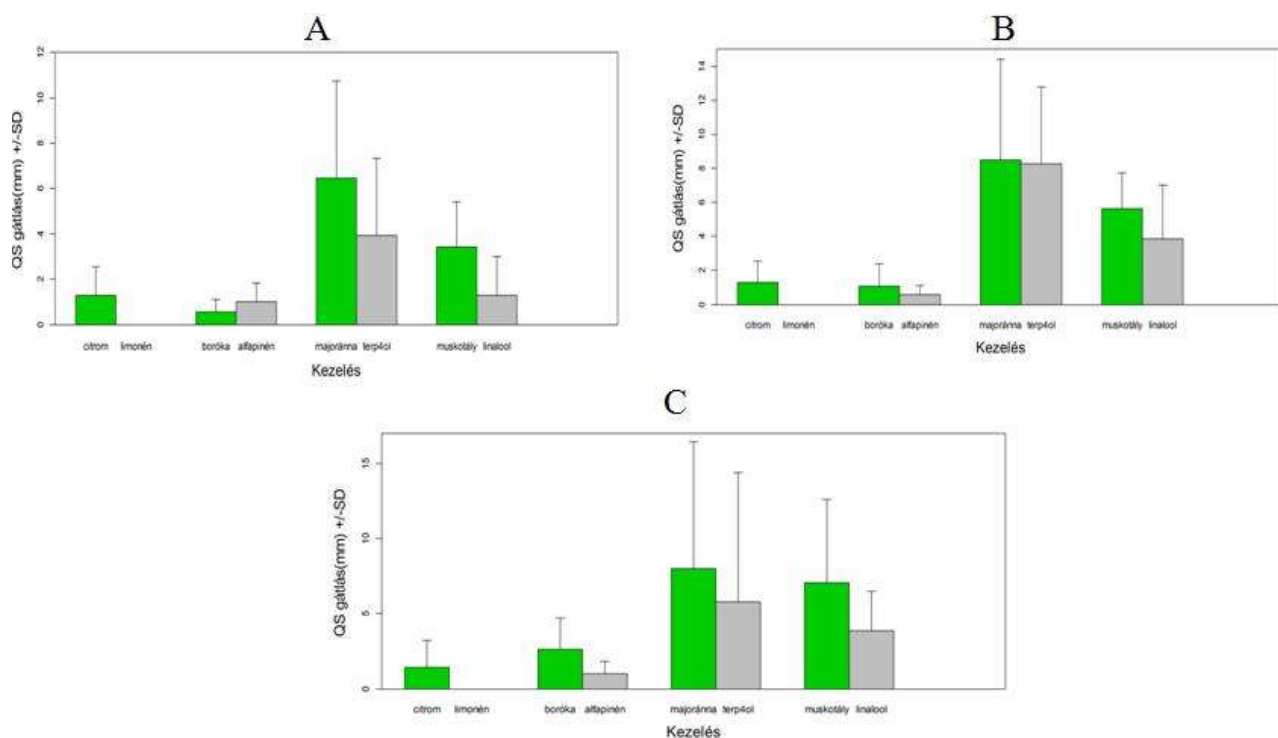
képzést gátló hatást mutattak, mint komponenseik, a muskotályzsálya esetében pedig a komponens bizonyult hatásosabbnak illetve a kontrollhoz képest a terpinén-4-ol és a linalool mutat jelentősebb csökkenést. Azonban a tesztek alapján, ezek az eltérések nem bizonyultak szignifikánsnak. Az 2.ábrán ezúttal is a szignifikáns eltéréseket különböző, a nem szignifikáns eltéréseket pedig azonos betűkkel jelöltük.



2.ábra Illóolajok és illóolaj komponensek hatása a *Pichia anomala* biofilm képzésére

3.2 QS gátlás mérése

Az eredmények kiértékeléséhez, lemértük a papírkorongok körül keletkezett depigmentált zónákat, ezeket átlagoltuk és a kontrollhoz viszonyítottuk. A kontroll esetében, a csészékre helyezett korongot teljesen benőtte a baktérium. A felhasznált olajok mindegyike esetében észleltünk QS gátlást, hol kisebb, hol nagyobb mértékben. Az adatokat átlagoltuk és feltüntettük az átlagoktól való eltéréseket is.



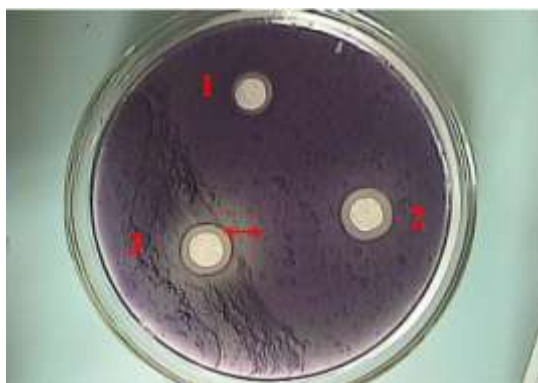
3. ábra Illóolajok és komponenseik anti-QS hatása. Az **A** ábrán az 1 µl, a **B** ábrán a 2 µl és a **C** ábrán a 3 µl-es kezelés látható. A kezelése a következő sorrendben szerepelnek: citrom, limonén, boróka, α-pinén, majoránna, terpinén-4-ol, muskotályzsálya, linalool.

A citrom-olaj esetében megfigyelhető, hogy a QS gátlás jelen van, de minimális. A limonén esetében pedig egyáltalán nem észleltünk QS gátlást (3.ábra, 4.ábra). A kezelés koncentrációjának növekedésével sem változott meg ez a trend.



4. ábra A citrom illóolaj anti-QS hatása

A boróka esetében megfigyelhető, hogy a QS gátlás koncentrációfüggő. Magasabb koncentrációjú olaj felvitele esetében, az olaj erősebb hatást fejtett ki és mindegyik esetben jobb QS gátló, mint fő komponense, az α-pinén (3.ábra, 5.ábra).



5. ábra A boróka illóolaj anti-QS hatása

A majoránna esetében volt megfigyelhető a legnagyobb QS gátlás, úgy az olaj, mint ennek fő komponense esetében és mindkettőnél a legjobb gátlást 2 μ l-nél érték el. Ebben az esetben is az olaj hatásosabb volt, mint a komponense (3.ábra, 6.ábra).



6. ábra A majoránna anti-QS hatása (2 μ l)

A muskotályzsálya olaj a második legjobb QS gátlónak bizonyult, a komponens hatása ebben az esetben is gyengébb volt. A legjobb gátlást a legmagasabb koncentrációnál érték el (3.ábra, 7.ábra).



7. ábra A muskotályzsálya anti-QS hatása (2 μ l)

IV. Következtetések

Az egyre rezisztensebb mikrobiális törzsek megjelenése arra ösztönzi a kutatókat, hogy olyan antimikrobiális szereket találjanak, amelyek hatékonyak, de nem vezetnek fokozott rezisztenciához. Keresés elindult tehát olyan anyagok irányába, amelyek természetes eredetűek, mint például az illóolajok. Ugyanakkor a mikroorganizmusok biofilmet kialakító képessége megnehezíti a kezelések alkalmazását ugyanis ezek sokkal rezisztensebbek, mint a lebegő (planktonikus) formák (Lewis 2001).

Az ételmérgezést okozó *Bacillus cereus* Gram pozitív baktérium biofilm képzése számos tényezőtől függhet. Egy 2009-es kutatásban kimutatták, hogy a *B. cereus* baktérium sejtek mozgásképessége fontos szerepet játszik a mikrotiter lapokra való letapadásuk esetében. A mozgásképesség abban az esetben is előnyös, amikor új sejtek válnak részeseivé a biofilm közösségnek, a mozgékonyabb sejtek hamarabb bekerülnek, és védelmet élvezhetnek (Houry 2009). A biofilmeket körülvevő szerves mátrixnak fontos szerepe van a rezisztencia kialakításában is valószínűleg azért, hogy közvetlenül kapcsolódva az antibiotikumokhoz vagy más gátlószerekhez, fékezi ezek bejutását a biofilm belsejébe (Donlan 2000). Feltételezhető, hogy az illóolajok esetében is hasonló a helyzet.

Eredményeink azt mutatják, hogy a felhasznált illóolajok csökkentették a biofilm képzést a *B.cereus* esetében. Az illóolajok fő komponensei hatékonyabban gátoltak, mint maguk az illóolajok. A komponensek szerkezetéből kiindulva, a monoterpének (α -pinén és limonén) hatékonyabban gátolták a biofilm képzést, mint a terpén-alkoholok (linalool és terpinén-4-ol). Valószínűleg ezek az összetevők befolyásolhatták a sejtek mozgásképességét és mivel elsődleges célpontjuk a sejtfal és a sejthártya lehetséges, hogy a megtámadott, sérült sejt elvesztette felülethez tapadó képességét. Ugyanakkor hatékonyabban áthatolhattak a már meglevő (4 óra tapasztás után) biofilmet körülvevő mátrix burkon ezáltal elérve a sejteket ahol kifejthették hatásukat. Kutatások kimutatták, hogy a *Streptococcus epidermalis* Gram pozitív baktérium esetében egyes illóolajok a biofilm teljes leválását okozták a letapadási felületről és leválás után a sejtek is elpusztultak (Nuryastuti és mtsai 2009). Fontos megemlíteni, hogy eredményeink ellentétben állnak egy 2008-ban végzett kutatással, ahol *Listeria monocytogenes* Gram pozitív baktériumok biofilmje esetében az illóolaj komponensek serkentették a biofilmek képződését. A kutatásban az általunk használt α -pinén, limonén és linalool komponenseket is vizsgálták. Az eredményeket azzal magyarázták, hogy szükség lenne az illóolaj teljes összetételére ahhoz, hogy ki tudja fejteni gátló hatását, a

komponensek önmagukban erre nem voltak képesek (Sandasi és mtsai 2008). A mi esetünkben azonban a komponensek hatékony biofilm képződést gátló szereknek bizonyultak, ez valószínűleg a *Bacillus* és *Listeria* biofilmek közötti különbségekből adódik. A szakirodalom szerint, a *Listeria* az egyik legvirulensebb ételmérgezést okozó baktérium, tehát elképzelhető, hogy az általa képzett biofilmek sokkal rezisztensebbek a gátlószerekkel szemben.

Az élesztőgombák hasonló okok miatt és hasonlóképpen alakítanak ki biofilmeket mint a baktériumok. A *P.anomala* biofilmek esetében csak a majoránna olaj bizonyult hatékony gátlóanyagnak. Más élesztők, például *Candida albicans* vagy *Saccharomyces cerevisiae* esetében kimutatták, hogy a biofilmek által képzett szerves mátrix összetétele nagyon változó, akár fajfüggő is lehet a gombák esetében (Baillie és Douglas 2000). Ez nagymértékben befolyásolhatja a biofilm képzést gátló anyagok hatását. Ugyanakkor a *S.cerevisiae* kevésbé virulens, mint a *C.albicans* és kutatások során sikerült kimutatni, hogy ez utóbbi által képzett biofilmet körülvevő mátrix összetettebb volt (Chandra és mtsai 2001). A szakirodalom eléggé szegényes, ami a gombák által képzett biofilmeket illeti, de néhány kutatásban fellelhető, hogy ezen biofilmek rezisztenciáját nemcsak a változatos szerves mátrix, hanem a felületfüggő génexpresszió is befolyásolja, tehát a letapadási felület hatással lehet a rezisztenciára (Jenkins és Douglas 2002). Az általunk vizsgált *P. anomala* biofilmek rezisztenseknek bizonyultak az összes olaj és komponens hatására, kivéve a majoránnát, amelynek hatása szignifikánsan eltért a kontroll csoportétól. A komponensének (terpinén-4-ol) hatásától való eltérés azzal magyarázható, hogy az olaj teljes összetétele szükséges volt arra, hogy gátolja az élesztő biofilmképzését. Feltételezhető, hogy az élesztő biofilmek ellenállóbbak a felhasznált olajokkal szemben.

Az anti-QS hatás esetében mindegyik olajnál és komponensnél sikerült QS gátlást kimutatni, kivéve a limonént, ahol a komponens önmagában nem volt elég a gátláshoz. A legjobb eredményt a majoránna olajnál és komponensénél értük el és ez kapcsolatba hozható a *B.cereus* és *P.anomala* biofilm képzését gátló hatással is. A QS mechanizmusnak fontos szerepe van a biofilmek kialakulásában, ezért ennek gátlása befolyásolja a biofilmképzést is.

Eredményeink alapján az illóolajok, mint természetes eredetű szerek felhasználása élelmiszerek tartósítására, illetve az élelmiszeriparban használt eszközök felületének biofilm mentesítésére, gyakorlati szempontból is ígéretes terület. Az általunk felhasznált olajok és komponenseik hatékony biofilm képzést gátló és anti-QS anyagoknak bizonyultak, különösen a majoránna és fő komponense a terpinén-4-ol.

v. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani itthoni témavezetőmnek, dr.Papp Judit tanárnőnek biztatásaiért és útmutatásaiért.

Ugyanakkor köszönettel tartozom a magyarországi témavezetőimnek, dr.Krisch Juditnak és dr.Vágvölgyi Csabának, akik bizalmat szavaztak nekem, amikor Balassi ösztöndíjasként befogadtak és iránymutató szakmai tanácsaikkal segítette előrehaladásomat, és lehetővé tették munkámat a Szegedi Tudományegyetem TTIK Mikrobiológiai Tanszékén.

Köszönetemet fejezem ki dr. Takó Miklósnak a labormunka végzéséhez nyújtott hasznos szakmai tanácsokért és segítségért illetve László Zoltánnak és Dimény Orsolyának az adatok statisztikai feldolgozásában való útmutatásokért.

VI. Felhasznált irodalom

1. **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.
2. **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.
3. **Al-hussaini, R., Mahasneh, A.M.** (2009). Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules.* **14**:3425-3435.
4. **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.
5. **Annous, B.A., Fratamico, P.M., Smith, J.L.** (2009). Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do. *J. Food Sci.* **74**: 24-36.
6. **Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J.** (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *J. Food Microbiol.* **21**: 33–42.
7. **Baillie, G.S., Douglas, L.J.** (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J.Antimic. Chemother.* **40**:397-403.
8. **Bakkali, F., Averbeck, S, Averbeck, D., Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem.Toxicol.* **46** 446–475.
1. **Burt, S.** (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food. Microbiol.* **94**: 223– 253.
2. **Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K, Hoyer, L.L., McCormic, T., Ghannoum, M.A.** (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans* : development, architecture, and drug resistance. *J.Bacteriol.* **183** (18):5385-5394.
3. **Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P.** (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistant infections. *Science* **284**:1318-1322.
4. **Donlan, R.M.** (2000). Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAJO J.*, **46**:47-52.
5. **Dorman, H.J.D., Deans, S.G.** (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 308–316.

6. **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.
7. **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.
8. **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**:3803–3815.
9. **Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M.** (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiol.* **156**:1009-1018.
10. **Jenkinson, H.F., Douglas, L.J.** (2002). Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections. In: Brogden, K.A., Guthmiller, J.M., (szerk). Polymicrobial diseases, ASM Press, Washington.
11. **Johnson, L.R.** (2007). Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J. Theor.Biol.* **251**: 24-34.
12. **Khoury, A.E., Lam, K., Ellis, D., Costerton, J.W.** (1992). Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO J.* **38** (3): 1-6.
13. **Kumar, C.G., Anand, S.K.** (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **42**:9-27.
14. **Lewis, K.** (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicro. Agents Chemother.*, **45**:1007-1012.
15. **Lynch, M.J., Swift, S., Kirk, D.F, Keevil, C.W., Dodd, C.E.R., Williams, P.** (2003). The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ. Microbiol*, **4**:18-28.
16. **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.
17. **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.

18. **Nuryastuti, T., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Iraveti, S., Aman, A.T., Krom, B.P.** (2009). Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75** (21): 6850–6855.
19. **Papp, J.** (2009). A baktériumok biotikus kapcsolatai. In: Papp, J.(szerk.), Általános mikrobiológia I., Kriterion, Kolozsvár, p.183-185.
20. **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.
21. **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.
22. **Prakash, B., Veerogowda, B.M., Krishnappa, G.** (2003). Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr. Sci.* **85** (9): 1299-1307.
23. **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.
24. **Ramey, B.E., Koutsoudis, M., Bodman, S.B.V., Fuqua, C.** (2004). Biofilm formation in plant – microbe associations. *Cur. Opin. Microbiol.* **7**:602-609.
25. **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.
26. **Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M.** (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Contr.* **19**:1070-1075.
27. **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.
28. **Spoering, A., Lewis, K.** (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Society.* **183** (23):6746-6751.
29. **Takeuchi, K., J. F. Frank.** (2000). Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce leaves as affected by inoculum size and temperature, and the effect of chlorine treatment on cell viability. *J. Food Prot.* **63**:434-440.

30. **Trachoo, N.** (2003). Biofilms and the food industry-review. *Songklanakarin J.Sci.Technol.* **25**(6): 807-815
31. **Tserennadmid, R.** (2010). Illóolajok és kombinációik hatása az élelmiszerromlást okozó mikroorganizmusokra. Doktori értekezés, Szeged, p. 54-55.
32. **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.
33. **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.
34. **Wallace, R.J.** (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc.* **63**: 621–629.
35. **Walker, J.T., Marsh, P.D.** (2007). Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. *J.Dentistry.* **35** (9): 721-730.
36. **Walker, G.M.** (2011). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *A. van Leeuwenhoek.* **99**:25-34.
37. **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.