

Néhány illóolaj felületi fertőtlenítő hatása fém és műanyag felületen

Vidács Anita

II. évfolyamos okleveles élelmiszermérnök

hallgató

Szegedi Tudományegyetem Mérnöki kar, Élelmiszermérnöki Intézet

Témavezető:

Dr. Krisch Judit

egyetemi docens

SZEGED

2012.

Tartalomjegyzék

BEVEZETÉS.....	3
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
1.1 Biofilm	4
1.2 Quorum sensing	8
1.3 Illóolajok	10
1.4 Baktériumok rezisztenciája	13
1.5 A kísérletekben használt baktériumok	15
1.6 Pásztázó elektronmikroszkóp.....	16
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	18
2.1 MIC (minimális gátló koncentráció) keresése	18
2.2 Hatóidő megállapítás.....	20
2.3 Biofilm képzés gátlása	20
2.4 Elektronmikroszkópos felvételek.....	24
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS.....	24
3.1 Minimális gátló koncentráció.....	24
3.2 Hatóidők.....	25
3.3 Biofilm gátlása	26
3.4 Elektronmikroszkópos felvételek.....	30
4. ÖSSZEFOGLALÁS	33
5. IRODALOMJEGYZÉK	35

BEVEZETÉS

A dolgozat célja újfajta, természetes eredetű, a biofilm képzést csökkentő gátlószer keresése. A fertőtlenítőszereket a mikroorganizmusok elpusztítására használják az élelmiszeriparban. Ha a mikroorganizmus populációja ki van téve eléggé magas koncentrációjú fertőtlenítőszernak, akkor alkalmas a sejtek megölésére. A mikroorganizmusok egy idő után alkalmazkodni tudnak a különböző fertőtlenítőszerekhez, illetve rezisztensé is válhatnak, ennek következtében a fertőtlenítőszerek már nem lesznek képesek az elvárt hatást kifejteni.

A tudomány fejlődésével, a kutatások révén az elmúlt évtizedekben egyre jobban vált ismertté a mikroorganizmusok viselkedése és környezetük rájuk gyakorolt hatása, mint például a rezisztencia kifejlődése a különböző fertőtlenítőszerekre. Ki kell emelni a mikroorganizmusoknak azt a képességét, hogy képesek a felületen megtapadni és egységet, biofilmet képezni, melynek következtében még ellenállóbbá válnak a környezeti hatásokkal szemben.

A biofilmek kialakulása komoly problémát jelent az élelmiszeriparban, mivel fertőzési források lehetnek: az eszközök felületéről átkerülhetnek az élelmiszerek felületére és vice versa. A biofilmek eltávolítása nehéz, sokszor a súrolás sem elegendő, a felületi fertőtlenítő szereknek pedig sokkal jobban ellenállnak, mint a szabad sejtek.

Dolgozatomban különböző illóolajokat (fahéj, boróka, citrom) használtam az élelmiszeriparból származó felületeken (műanyag és rozsdamentes acél) létrehozott bakteriális biofilmek (*Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*) számának csökkentésére, elpusztítására.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 Biofilm

Különböző felületekhez való tapadási képessége számos baktériumnak van, és biofilm alkotó képességük fő horderejű probléma a különböző iparoknál, főként az élelmiszeriparban, ahol a biofilm a szennyeződések állandó forrása. A biofilm szerkezete nem csak a letapadási felülettől, hanem a baktérium sejttől és a környezeti tényezőktől is függ (Van Houdt and Michiels, 2010). A biofilm biológiailag aktív mátrixa a sejtek és az extracelluláris anyagoknak a szilárd felülettel alkotott együttese (Kumar and Anand, 1998).

A biofilm emellett technológiai problémát is okoz. Például szűrési folyamatokban le tudja csökkenteni a membrán áteresztőképességét, melynek következtében a szűrés nem megfelelő lesz (Kumar and Anand, 1998).

A mikroorganizmusok felülethez tapadása egyfajta fizikokémiai folyamat, melyet a Van der Waals erők, az elektrosztatikus erők határoznak meg (Van Houdt and Michiels, 2010).

A biofilm képzés nagyon lassú folyamat, napok alatt néhány milliméter vékonyságot ér el, mely függ a kultúra állapotától. A megtapadás után a mikroorganizmusokhoz újabbak csatlakoznak, így sűrűbb lesz a biofilm, ennek következtében erősebb a kolónia tapadása a felülethez. A biofilm heterogén, különböző fajú mikroorganizmusok élnek együtt, melyeknek különböző létfenntartási igényeik vannak. A heterogén biofilm sűrűbb és stabilabb, mint az azonos mikroorganizmusok által alkotott (Kumar and Anand, 1998). A baktériumoknál az ostor felelős a mozgásért. Emellett részt vesz a kötődésben is a biofilm mátrixban. A pilusok segítségével a kötődés erősebb (Simoes et al., 2009).

A táplálék transzfer gyorsabb a biofilmben, mint a baktériumok vizes fázisában. A biofilmek megtalálhatók a rozsdamentes acélon, alumíniumon, üvegen, gumin, teflonbevonaton és nylonon, ezek az anyagok egytől egyig megtalálhatók az élelmiszeriparban. A teflonbevonat és a nylon sima felületű, de így is képes biofilm kialakulni. A rozsdamentes acélon pedig szemmel nem látható repedések vannak, melyekben könnyen megtapadnak a baktériumok (Kumar and Anand, 1998). Egy kísérlet során az *E. coli* a rozsdamentes acélon ($7,9 \times 10^3$ db/100 μ l), HDPE-n (nagy sűrűségű polietilén) ($7,56 \times 10^3$ db/100 μ l) és a grániton ($7,9 \times 10^3$ db/100 μ l) tapadt meg és növekedett legjobban. A Formica cég által gyártott laminált műanyag ($4,6 \times 10^3$ db/100 μ l) felületen alacsonyabb volt a biofilm sejtsűrűsége (Jun, W. et al., 2010).

A reverzibilis tapadás a felülethez van der Waals erőkkel, elektrosztatikus erővel és hidrosztatikus kölcsönhatásokkal lehetséges. Ebben a tapadási fázisban a baktériumok Brown-mozgást végeznek, ilyenkor könnyű eltávolítani őket öblítéssel (Kumar and Anand, 1998). A Brown-mozgás a gázokban és folyadékokban szuszpendált részecskék véletlenszerű, szüntelen

mozgása. Az oldószer molekulák megfigyelhetetlen, de állandó hőmozgása következtében a szuszpendált részecskéket véletlenszerűen ide-oda lökdösik (<http://hu.wikipedia.org> 2012).

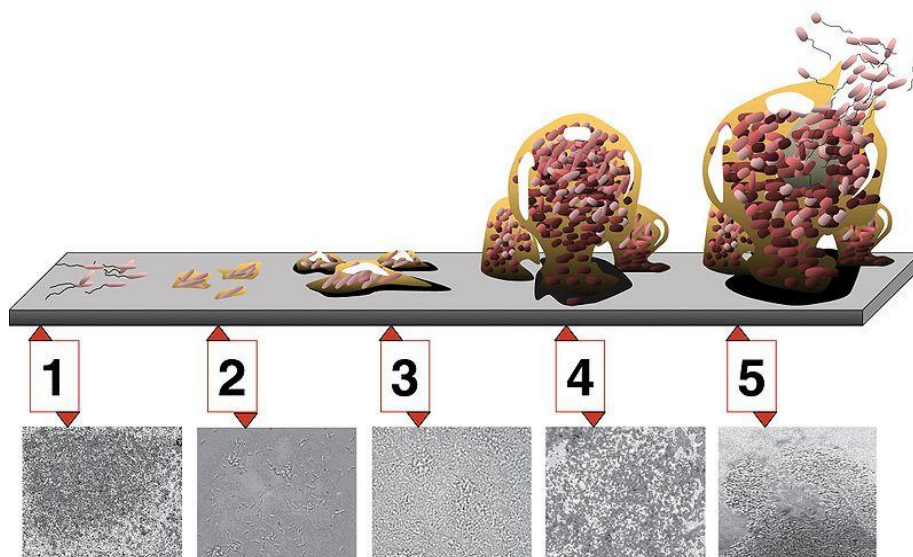
A biofilm fejlődése közben a tapadás visszafordíthatatlan a dipól-dipól kölcsönhatás, hidrogén-, ionos- és kovalens kötés miatt. Ilyenkor a baktérium populáció eltávolításához nagyobb erő kell, például a súrolás. A kötődés pH és hőmérsékletfüggő is: *Pseudomonas fragi* kötődésének a pH optimuma 7-8, *Yersinia enterocolitica* hőmérséklet optimuma 21°C, míg 35°C-on és 10°C-on már kevésbé képes biofilmet képezni rozsdamentes acélon. *Deleya marina*-nak 25°C a hőmérsékleti optimuma a biofilm képzésnél, ezzel szemben 19°C-on kevésbé képes rá, és 37°C-on a leggyengébb ez a képessége (Kumar and Anand, 1998).

Biofilm keletkezés folyamata (1. ábra):

- a baktérium megtapad a felületen
- a baktériumok jeleket küldenek egymásnak, hogy termeljenek EPS-t.

EPS -extracellular polymeric substances- a sejteket körülvevő kötőanyag. Az EPS-t poliszacharidok, proteinek, nukleinsavak, lipidek, foszfolipidek és huminsav alkotják. A proteinek és poliszacharidok alkotják a biofilm EPS komplexumának 75-89 százalékát. Az EPS mátrix egy fal, mely védi a biofilmben lévő mikroorganizmusokat a káros hatásoktól és felelős a sejtek közötti kommunikációért is. A poliszacharidok és proteinek meghatározzák a biofilm mechanikus stabilitását. A lipidek és nukleinsavak pedig befolyásolják a biofilm reológiáját és a stabilitását is.

- a tápanyag és oxigén felvétel közben egyre több baktérium tapad meg és egyre nagyobb mátrix (biofilm) alakul ki
- elérve egy kritikus sejtszámot, biofilm nagyságot, mikroorganizmusok válnak ki a mátrixból
- a kivált mikroorganizmusok újabb helyen megtapadnak és biofilmet képeznek (Simoes et al., 2009)



1. ábra Biofilm képződés folyamata (Monroe D., 2007)

Biofilm az élelmiszeriparban

A különböző szállítócsövekben meg tud tapadni a mikroorganizmus, melyekben a folyékony anyagot szállítják egymást követő munkafolyamatokhoz, mint például a gyümölcslé és tej gyártásánál. A biofilmek a csövek átmérőjét csökkenthetik, ezáltal az áramlás lassabb lesz, emellett a szűrők kapacitását is csökkentik, akár el is tömíthetik azokat.

A húsfeldolgozás során a biofilmmel szennyezett felülettel érintkező levágott állatok testét keresztiszennyezhetik a megtapadt és mátrixot alkotó baktériumok. Öt fokon tartott posztmortem csirke testen a *Listeria monocytogenes* tudott szaporodni. Emellett szarvasmarha húsnál is mutattak ki *L. monocytogenes* és *Pseudomonas fragit*, melyek megtapadtak már a hús felületén (Kumar and Anand, 1998).

A baktériumok a biofilmben olyan kémiai és biológiai reakciókat katalizálnak, melyek hatására korróziót tudnak okozni fém felületeken (csőrendszerben, tartályokban).

Tejipar esetén a nyers tejben a *Pseudomonas* fajok életműködésük során enzimeket termelnek, melyek közül néhány túléli a pasztörizálást, és működésük következtében csökkennek a termék érzékszervi tulajdonságai és az eltarthatósági idő is. A másik út melyen keresztül befolyásolja a késztermék minőségét a *Pseudomonas* spp., hogy utópasztörözés után is maradhatnak életképes sejtek a csomagolt tejben, ezáltal fertőzött lesz a pasztörizált tej (Simoes et al., 2009).

Pasztöröző rendszerben kialakult biofilm vizsgálata során a biofilm alkotó baktériumok 11%-a *E. coli* és 11% *Shigella* sp. volt. Kaviár feldolgozó egységben a biofilm alkotók 6%-a volt *Pseudomonas*, míg rák feldolgozónál 66% *Pseudomonas* sp. volt (Simoes et al., 2009).

A biofilm növeli a mikrobiológiai szennyeződések kockázatát. Az ellenállóbb mikroorganizmusokra kevésbé hatnak a fertőtlenítőszeresek, ezek segítségével a megtapadás könnyebb a többi mikroorganizmus számára a felületen. Ezután a sejtek mikrokolóniákat képeznek

és a quorum sensing (baktériumok egymás közötti kommunikációja) segítségével pedig újabb biofilmet alakítanak ki (Shi and Zhua, 2009).

Biofilm megszüntetés módszerei

Kontrolálni lehet a biofilm képződést különféle megelőző és megszüntető stratégiákkal (higiéniai szabályzatokkal, berendezések tervezésével, berendezés anyagával és a megfelelő tisztító/fertőtlenítőszer megfelelő fizikai módszer párosításával) (Kumar and Anand, 1998).

A tisztítási folyamatnak meg kell szüntetnie az EPS-t. Ennek az eltávolítása során a mikroorganizmusok több mint 90 százaléka elpusztul, de az életben maradt mikroorganizmusok máshol letelepedhetnek és új biofilmet képezhetnek (Simoies et al., 2009).

Fizikai lehetőség például szuper nagy mágneses tér vagy a magas pulzáló elektromos tér alkalmazása. Még hatásosabb, ha alacsony elektromos áramot kombináljuk antimikrobiális szerekkel. Az ionizáló sugárzás hatásosabb a *Salmonella* sp. biofilm sejteknél, mint a szabad sejteknél. Ennek következtében hasznos fertőtlenítő módszer a különböző élelmiszereknél és ezekkel érintkező felületeken. De ezen új módszerek mellett nem kell elhanyagolni a hagyományos módszereket sem, mint a súrolás (Van Houdt and Michiels, 2010).

Kémiai módszerek a különböző fertőtlenítőszer használata. A kelát tartalmú szerek (béta-aminoetil éter, EGTA) is segítik a biofilm megszüntetését. A kelátok megkötik a kalcium és magnézium ionokat, így destabilizálják a sejtek külső membránjait. A monolaurin 50 µg/ml koncentrációban 65°C-os, 5 perces hőkezelés során a *L. monocytogenes* biofilmet megszüntette (Van Houdt and Michiels, 2010).

Az, hogy melyik fertőtlenítőszer hatásos, több tényezőtől függ, a fertőtlenítendő felülettől, a hőmérséklettől, a hatóidőtől, a koncentrációtól, a pH-tól és a baktérium rezisztenciájától (Van Houdt and Michiels, 2010). A fertőtlenítőszernek hatásosnak, biztonságosnak és könnyen használhatónak kell lenniük, valamint leöblíthetőnek és nem toxikusnak (Simoies et al., 2009).

Néhány fertőtlenítőszer nem is hatásos a biofilm ellen, mint a higany-klorid vagy a formaldehid.

Az élelmiszereredetű baktériumok rezisztenciája a fertőtlenítőszerre több mint 24 órás biofilmnél nagyobb, mint a fiatalabb biofilmeknél. (Kumar and Anand, 1998)

A fertőtlenítőszer leghatékonyabbak a szabad sejteknél. A különböző fertőtlenítőszer is másképp hatnak a mikroorganizmusokra. A peroxisav hatásosabb, mint a klór a *Pseudomonas* fajok és *Listeria monocytogenes* biofilm inaktiválásánál rozsdamentes acélon. A nátrium-hipoklorit hatásosabb az *E. coli*, *P. fluorescens* és a *S. aureus* pusztításánál vagy eltávolításánál, mint a PAA - peroxiecetsav- a rozsdamentes acélon való megtapadásnál. Az ózon erős oxidálószer, így még több mikroorganizmusra hat, mint a klór vagy más fertőtlenítőszer. Az ózonnak az a tulajdonsága,

hogy többféle baktériumra hat, így nem csak a szabad sejteknél, hanem a biofilmnél is tudják használni, mint fertőtlenítőszer. Az aktív klór a legelterjedtebben használt komponens, mivel könnyű előállítani és gazdaságos (Van Houdt and Michiels, 2010).

Biológiai vonatkozásban a bioaktív komponenseket célszerű megemlíteni, mint például a nizin, amit a sajtgyártásnál a *Clostridium botulinum* spórák ellen használnak. Egy tanulmány kimutatta, hogy a felületen lévő nizin hatására kevesebb volt a *L. monocytogenes* száma (Kumar and Anand, 1998). A baktérium által termelt anyagcseretermékek, mint például a *Bacillus subtilis* által termelt surfactin feloldják a biofilmet, például a *Salmonella enterica*, *E. coli* és *Proteus mirabilis* baktériumoknál. A vaskötő proteinek, mint a laktoferrin képesek gátolni az *E. coli* növekedését. (Simoes et al., 2009)

Egyes enzimek, mint az alfa-amiláz és béta-glukonáz hatásos volt ipari biofilmnél a papírgyártásban. Az üvegről és az anyag felületéről a *Staphylococcus*-t és az *E. coli*-t az endo-béta-N-acetil-glukozaminidáz eltávolította (Kumar and Anand, 1998).

Az enzim alapú tisztítószer: proteolitikus és glikolitikus enzimek szinergikus hatást mutattak az *E. coli* biofilmre rozsdamentes acélon, 10 másodperc hatóidő után eltűnt a biofilm 61-96%-a (Simoes et al., 2009).

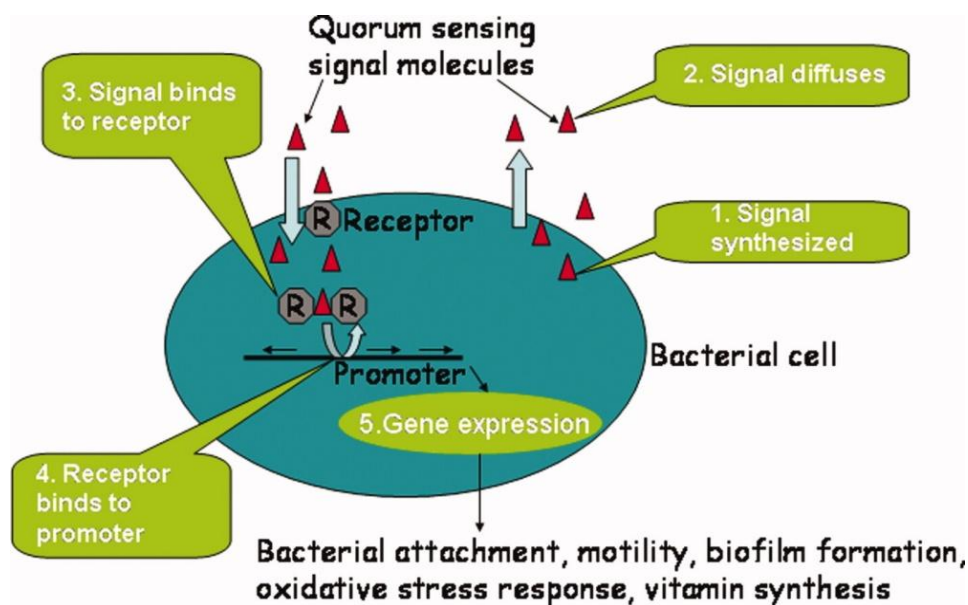
Nem mindegyik biofilm okoz problémát. Egyes biofilmek képesek biológiailag lebontani számos toxikus komponenst és a szennyeződések rétegződését is képesek csökkenteni (Kumar and Anand, 1998).

Fágok (vírusok, melyek baktériumot gátolnak/pusztítanak) szabályozzák a mikroorganizmusokat és az általuk képzett biofilmet is (Simoes et al., 2009).

1.2 Quorum sensing

A környezethez való alkalmazkodás nem egy baktériumtól fog függeni, hanem a közösségtől, tehát csak közösen tudnak alkalmazkodni a változásokhoz. A közösségben túl tudnak élni, ha összehangolják mechanizmusait. Az összehangolásban játszik szerepet a quorum sensing (QS), vagyis „az egyedi sejtek kis molekulatömegű jelző részecskék segítségével érzékelik, ha a populáció elérte azt a minimális egységet, vagy quoromot, amely az egész populációra ható választ indukál. A sensing a körülmények érzékelésére utal, ilyen például az egyedsűrűség, a tápoldat összetétele, a környezet érzékelése vagy más fajok egyedeinek jelenléte.” (<http://aok.pte.hu> 2012).

A baktérium jelzőmolekulákat juttat a környezetbe, melyet az egység többi tagja a jel receptorával tudja érzékelni, majd feldolgozni és azonos módon reagálni a külső körülményekre, változásokra (2. ábra). (Bassler, 1999)



2. ábra Quorum sensing mechanizmusa (<http://lawrencekok.blogspot.hu> 2012)

A QS segítségével a baktériumok nem csak alkalmazkodni tudnak a környezethez, de képesek biofilmet kialakítani, a biofilm szerkezetét módosítani és rezisztensé válni egyes anyagokra (Whitehead et al., 2001).

A QS számos fajnál tudja befolyásolni a biofilm képződést, például az acil- homoszerin lakton, (HSL) segítségével. Egyetlen enzim felelős a jel szintéziséért, a jel maga az acil-HSL, mely képes átdiffundálni a sejtmembránon és kölcsönhatásba lép a citoplazmikus DNS-kötő receptorral, mely módosítja a QS-szabályozott gén kifejeződését. Ez a típusú QS a Gram negatív baktériumoknál fordul elő. Az acil-HSL alapú QS a vad típusú *Serratia liquefaciens*-nél heterogén, fennmaradó sejtalkotók és a sejtek hosszú rostjai/szálai vannak jelen a biofilmben. Ezzel szemben megváltoztatott (mutálódott) acil-HSL következtében vékony, hiányos összetételű és szálú biofilm keletkezett. A quorum sensing gátlása lehetséges megoldás lehet arra, hogy a biofilmből kiváljanak a baktériumok, így az elpusztításuk is könnyebb lehet (Whitehead et al., 2001).

A QS-t lehet gátolni különböző illóolajokkal (rózsa, levendula, rozmarin, muskátli, fokhagyma, vanília, fahéj). Emellett a köménymag metilalkoholos kivonata is gátolta a QS-t:

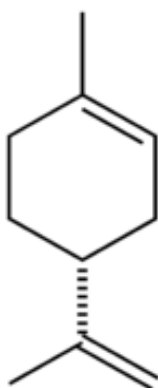
- zavarta az acil-homoszerin-lakton aktivitását
- biofilm kialakulást és
- a mozgásképességet.

Köménymag kivonatban található metil-eugenol 10µg/ml koncentrációban körülbelül 90%-ban gátolta a biofilm kialakulást (Packiavathy et al., 2012).

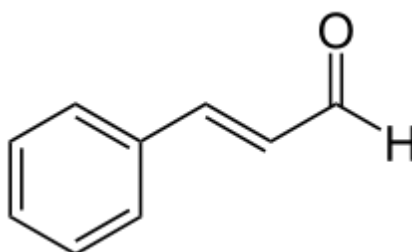
1.3 Illóolajok

Az illóolajok vízben nem oldódó, illékony folyadékok, melyeket növényi részekből (gyökér, szár, kéreg, levél, virág, bibe) vonnak ki, főként vízgőz desztillációval. Az illóolajok több komponensből állnak, de főként pár komponens a meghatározó, melyek 20-90 százalékban megtalálhatók benne (Burt, 2004).

Az illóolaj összetevőit nagyobb részben terpének és terpenoidok teszik ki, emellett tartalmazhat még fenolt és származékait, alifás származékokat és kén- és nitrogéntartalmú vegyületeket. Az illóolajokat főként élelmiszeripari, kozmetikai és gyógyászati célokra használják. Az illóolajok több mint 90%-át terpének (több izoprén egység összekapcsolódása) alkotják. Megkülönböztetünk monoterpéneket ($C_{10}H_{16}$), szeszkviterpéneket ($C_{15}H_{24}$), diterpéneket ($C_{20}H_{32}$), triterpéneket ($C_{30}H_{48}$) és tetraterpéneket ($C_{40}H_{64}$), attól függően, hogy hány izoprén egységből állnak (Csapó és Csapóné, 2003).



3. ábra Limonén ($C_{10}H_{16}$): monociklikus monoterpén, a boróka illóolaj egyik összetevője (Csapó és Csapóné, 2003)



4. ábra Fahéjaldehid (C_9H_8O): aromás vegyület, fenol származék, a fahéj illóolaj egyik összetevője (Csapó és Csapóné, 2003)

Illóolajok története:

Az ókor óta használják a fűszereket és a belőlük készült kivonatokat parfümként, ízesítőszerként és tartósítószerként. Az illóolaj desztillációval való előállítása több mint 2000 évvel ezelőtt elsőként Keleten (Egyiptom, India és Perzsia) történt. Az eljárást a 9. században az arabok tökéletesítették. A 13. században az illóolajokat a gyógyszertárak is előállították és elemezték a

gyógyászati hatásukat. Használatuk azonban Európában a 16. századig nem terjedt el széles körben. A 17. században a gyógyszertárakban 15-20 különböző illóolajat lehetett már kapni (Burt, 2004).

Az illóolajok és más növényi kivonatok rendelkeznek antibakteriális, antifungális és antivirális hatással, ezeket a tulajdonságokat próbálják kihasználni újfajta mikroorganizmus elleni szerekben és az élelmiszer tartósításban (Solórzano-Santos et al., 2012).

Általában a fő komponensek felelnek a biológiai hatásokért.

Az illóolajok koagulálják a citoplazmát és rongálják a lipideket és a proteineket. A sérült sejttel és membrán következtében a makromolekulák kifolynak és feloldódnak a környezetben. Emellett megváltozik a membrán áteresztőképessége, abnormális áteresztést idéz elő, ami következtében oxidatív stressz alakul ki és a külső és belső mitokondriális membrán áteresztőképességének változása miatt a sejt meghal nekrozisban.

A legtöbb illóolaj nem fejt ki mutációt a mikroorganizmusokban (Bakkali et al., 2008).

Az illóolaj kihozatal függ a növény fajtájától és a növényi résztől. Az illóolaj előállítás leggyakrabban a már említett vízgőz desztillációval történik, de emellett más eljárással is ki lehet nyerni az olajt (extrakció, fermentáció) (Solórzano-Santos et al., 2012).

Vízgőz desztilláció során az anyagot víz-gőz bevezetésével forralják. A forrásponton az anyagból előállított elegy úgy viselkedik, mintha az egymásban nem oldódó komponensek külön volnának jelen a rendszerben. Az elegy és a tiszta komponens forráspontja más, a tiszta komponensé magasabb. Az tiszta komponens (illóolaj) és az elegy a rendszer különböző részében válik ki (Dr. Szabó et al., 1987).

Munkám során három fajta illóolajat használtam: boróka, citrom és fahéj.

Borókaolaj: A *Juniperus communis* álbogyójából készítik, melyből 2-3 százalékot tudnak kivonni vízgőz desztillációval. Az illóolaj 40 százaléka alfa-pinén, 12 százaléka mircén (szénhidrogén monoterpén, mely kettő 5 szénatomos –izoprén - terpén összekapcsolódása (Krisch, 2012)), 7 százaléka béta-pinén, 6 százaléka terpinén-4-ol, 5 százaléka szabinén és 3 százaléka limonén. A boróka illóolaj színe színtelen illetve halványsárga, illata jellemezően fűszeres, fenyő- és borsszerű. A boróka illóolaj pozitív tulajdonsága, hogy antimikrobiális hatással rendelkezik, fertőtlenít, vizelethajtó és krónikus ízületi gyulladás esetén is hatásos, emellett még gyulladáscsökkentő is. (<http://aromax.hu> 2012)

Citromolaj: A *Citrus limon* az európai citromfa gyümölcsének héjából nyerik ki 0,5-1,5 százalékban. Kétféleképpen nyerhető ki egyik a már említett vízgőz desztilláció a másik eljárás a préselés, mely során a héjat préselik, a kifolyt folyadékot szűrik és centrifugálják. A citromolaj fő komponense a limonén 60– 80 százalékban (szénhidrogén monoterpén (Krisch, 2012)), emellett megtalálható még benne 10 százalékban a béta- és gamma-pinén, minimális mennyiségben (0,15-0,25%) a bergaptén. Színe halványsárgás, -zöldes, illata pedig a citromhéjra emlékeztető.

Elsősorban az egészségügyben a légtér tisztítására /fertőtlenítésére/ használják, így antimikrobiális és antivirális hatása is van. A kozmetikai iparban is megjelenik egyes készítményekben, frissítő vagy nyugtató hatású összetevőként (<http://aromax.hu> 2012).

Fahéjolaj: A fahéj illóolaj a fahéjfa, *Cinnamomum zeylanicum* kérgéből származik, melyet 0,5-4 százalék mennyiségben tudnak kinyerni. Emellett a fahéjfa leveleiből és húsosabb hajtásaiból is nyerhető ki olaj. A fahéj illóolaj fő komponensei (65-75%) a fahéjaldehid és az eugenol a kéregből nyert olajban. Színe világossárga vagy sötétebb sárga, illata fűszeres, fahéjra jellemző. Élettani hatásai között megemlítendő, hogy antimikrobiális, fertőtlenítő (fahéjaldehid), parazita és vírusellenes, bőrvörösítő, gyulladásgátló, és bélmozgást serkentő. Alkalmazásának legfontosabb területei a hüléses megbetegedések, légúti fertőzések és szájüregi gyulladások. A fahéjkéreg illóolaj nem toxikus, közepesen irritáló, nyálkahártya irritáló, nem fototoxikus (<http://aromax.hu> 2012).

Egy tanulmányban *E. coli*-nál keresték a MIC-et (MIC: minimum inhibitory concentration: minimum gátló koncentráció: az illóolajok minimum mennyisége, mely 90 százalékban csökkenti a populáció növekedését.), a bazsalikom és a koriander illóolaj bizonyult a leghatásosabbnak, ahol a minimum gátló koncentráció 2,5-5 µl/ml volt. A szegfűszeg illóolajnál a MIC 2,5 µl/ml, az MBC 3 µl/ml (MBC: minimum baktericid concentration: minimum baktériumölő koncentráció: az illóolaj minimális koncentrációja, mely 99%-ban megöli a mikroorganizmusokat.) (Moreire et al., 2005)

A legtöbb tanulmány alapján a Gram pozitív baktériumok kevésbé érzékenyek az illóolajokra, mint a Gram negatívak (Solórzano-Santos et al., 2012).

Az *E. coli* rezisztens számos antibiotikumra. Néhány tanulmány kimutatta, hogy a geraniolnak (monoterpén (Csapó és Csapóné, 2003)) jó hatása volt néhány Gram negatív baktérium gyógyszer rezisztenciájának változásában, a cél efflux mechanizmusban (a mechanizmus, mely a komponenseket a sejten kívülre pumpálja (Davidson and Harrison, 2002)), mint például az *E. coli*, a *Enterobacter aerogenes* és *P. aureginosa* esetén. Emellett felülírta az efflux pumpát, így változott a törzsek gyógyszerekre való érzékenysége (Solórzano-Santos et al., 2012).

1.4 Baktériumok rezisztenciája

A baktériumok képesek alkalmazkodni a környezetükhöz, majd a későbbiekben ezekre a környezeti hatásokra rezisztenssé válni. Néhány sejtnek azonban van természetes rezisztenciája, vagy ezt szerezhethetnek később mutáción vagy genetikai változásokon keresztül, és így túlélnek és nőnek. (A fejlődött rezisztenciát úgy nevezik, mint tolerancia, alkalmazkodás vagy hozzászokás attól függően, hogy miképpen van kitéve a stressznek és fiziológiai körülményeknek a mikroorganizmus.)

Változások a rezisztencia következtében:

- inaktiválása vagy módosítása a szereknek a sejten belüli enzimekkel,
- az enzimatis vagy metabolikus lépések hiánya,
- a gyengített felvétele vagy effluxa a szereknek és
- a célhely változása vagy a célmolekula túlermelése.

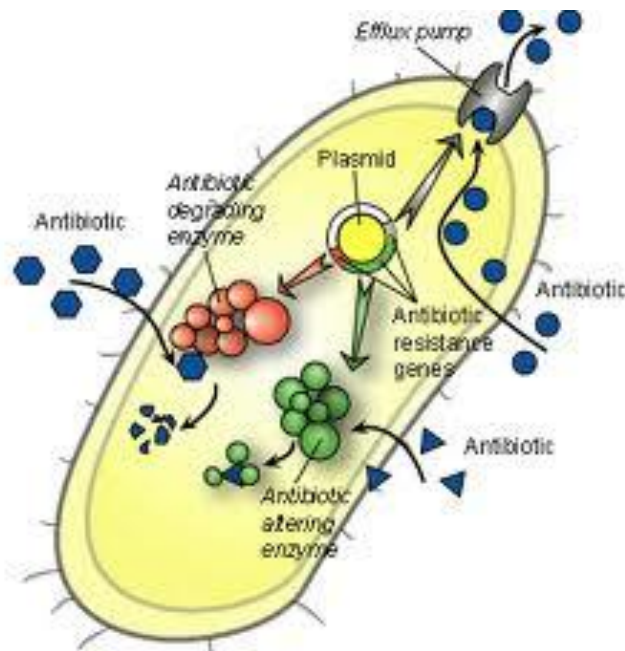
A mikroorganizmusok rezisztenciája lehet öröklött, látszólagos vagy szerzett. A mikroorganizmusok fejleszthetnek szerzett rezisztenciát például a folyamatos klór kitettség által. Majd ez a szerzett rezisztencia a szaporodás közben átöröklődik az utódokba (DNS-be van már belekódolva a rezisztencia).

A tisztítószerekre való rezisztenciát elsődlegesen az öröklődés okozza.

Az 5. ábrán látható a baktérium rezisztens gének által irányított reakciója az antibakteriális szerekre. A sejt által használt mechanizmusok a következők lehetnek:

A 3 féle hatás:

- ATP-függő efflux pumpa: a baktérium a sejten kívülre juttatja a szert
- enzimek segítségével lebontja a hatóanyagot
- enzimek átalakítják a szereket, hogy ne tudják gátolni a szaporodásukat.



5. ábra Baktérium reakciója az antimikrobiális szerekre (<http://enfo.agt.bme.hu> 2012)

Mint bármely tartósítási technológia, a fertőtlenítőszerekre való érzékenység is függ az alkalmazott körülményektől. A szerves savak képesek áthatolni a mikroorganizmusok citoplazma membránján, hatásosabbak protonált formában, leghatásosabbak nem disszociált formában. Hogy milyen formában vannak, az a környezeti pH-tól függ.

Amikor a mikroorganizmusok kapcsolódnak a felülethez vagy a biofilmhez, még rezisztensebbek lesznek az antimikrobiális szerekre, mint a szabadon mozgó sejtek.

Baromfiból izolált *L. monocytogenes* rezisztenciát mutatott (MIC=16µg/ml) a kvaterner ammónium tisztítószerre és a benzalkonium klórra. A rezisztencia plazmid eredetű volt. A plazmid gének kódolták az energia-függő efflux rendszert (Davidson and Harrison, 2002).

1.5 A kísérletekben használt baktériumok

Az élelmiszer eredetű megbetegedéseknek/fertőzéseknek/mérgezéseknek okozói gyakran baktériumok. Ezek a baktériumok származhatnak az alapanyagból, a jó higiéniai gyakorlat be nem tartásából is. A zoonózist (állatról emberre terjed) okozó baktériumok például a *Salmonella* szerovariánsok, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Talajból, ivóvízből bekerülő baktériumok, melyek élelmiszeromlást okozhatnak a *Pseudomonas* és *Acinetobacter* (Laczy, 2008).

Pseudomonas putida: A *Pseudomonas* genus spórát nem termelő baktériumokból áll. A *Pseudomonas putida* opportunista kórokozó, húgyúti, légúti fertőzést és szepszist okozhatnak immunhiányos embereknél. Antimikrobiális készítményekre rezisztensek (Ádám, 2006). Gram negatív talajlakó baktérium, mely pálcika alakú. Képes lebontani az organikus oldószereket, mint a toluolt (metilbenzolt), ezért használják a bioremedációban, ahol a mikroorganizmusok bontják le az olajat. (<http://en.wikipedia.org> 2012). A baktériumot jó biofilm képző képessége miatt választottuk modell szervezetnek.

Escherichia coli: a bélflóra egyik normál lakója, emellett a bőrön és a garat nyálkahártyáján is megtalálható. Megakadályozza a patogén mikroorganizmusok megtelepedését a bélben illetve a vitamin ellátáshoz is hozzájárul a B és K vitamin szintézisével. Élelmiszerben és vízben már patogén mikroorganizmusok, melyek fertőzéseket okozhatnak. Az általuk okozott kórkép lehet különböző szervek megbetegítése illetve enterovirulens törzsek általi megbetegedés.

Enterovirulens *E. coli* törzsek:

- Enteropatogén *E. coli* (EPEC): csecsemőknél nyákos székletet okoz
- Enteroinvazív *E. coli* (EIEC): véres hasmenést okoz
- Enterotoxint termelő *E. coli* (ETEC): hasmenést okoz
- Enterohaemorrhagiát okozó *E. coli* (EHEC): véres széklet, gyerekeknél és időseknél életveszélyes szövődmények okozhat
- Enteroaggresszív *E. coli* (EaggEC): vizes hasmenést okoz (Ádám, 2006).

1.6 Pásztázó elektronmikroszkóp

A képalkotás egy tárgyról kétféleképpen történhet, leképezéssel (látás) vagy pontonként való kirajzolással-pásztázással- (televízió). A pásztázó mikroszkóppal jobb minőségű kép készülhet és jobban korrigálhatók a leképezési hibák.

A pásztázó elektronmikroszkópokban fókuszált elektronsugarakat használnak a kép létrehozásához. Az elektronok a minta atomjaival kölcsönhatásba lépnek és ennek következtében az atomok elektromos terén szétszóródhatnak, és másodlagos elektronokat üthetnek ki különböző elektronhéjakról. Az így megüresedett alacsonyabb energiaszintű belső héjra egy külső héjról elektron lép át, és a héjak közti energiakülönbség karakterisztikus röntgensugárzás formájában távozik, vagy az energiakülönbséget elektronok viszik el (Auger elektronok).

A készülékek az elektronnyaláb-minta kölcsönhatás során a mintából kilépő elektronokat és sugárzást detektálják. A pásztázó elektronmikroszkópban főleg a visszaszórt és szekunder elektronok detektálásán alapuló képalkotást használják.

A pásztázó elektromikroszkóp két fő részből áll az egyik a torony, melyben az elektronsugarakat létrehozzák és fókuszálják kis pásztázó pontokká, emellett a szekunder és visszaszórt elektronokat is itt gyűjtik be. A berendezés másik része az elektronikai vezérlő és tápegység. Az elektronágyú stabilizált nagyfeszültséget, a katód feszültségét, a lencsetekercsek és sugáreltérítő tekercsek stabilizált áramát, úgyszintén a különböző szelepek, szivattyúk, ellenőrző rendszerek áramellátását, a villamos tápegységet végzi.

A mikroszkóp elektronikai egységét vezérlő számítógépes programmal lehet beállítani az elektronnyaláb paramétereit, a fókuszálást, a nagyítást és a kép intenzitását, kontrasztját.

Az elektronágyúban (ahol a téremissziós katód van, mely az elektronforrást biztosítja) ultra nagy vákuumra van szükség, hogy minél kevesebb gázmolekulával találkozzon az elektronnyaláb.

A téremissziós katód legfontosabb része egy volfrám, melyre nagyfeszültséget (extracting voltage) kapcsolva az elektronok a csúcs közelében fellépő nagy elektromos térerősség hatására hidegemisszióval lépnek ki. Ezeket az elektronokat egy második anódra kapcsolt gyorsító feszültséggel (accelerating voltage) gyorsítható. A gyorsított elektronok fókuszálására elektronlencsét használnak. Az elektronágyúhoz közeli lencse (kondenzor) az elektronnyalábot fókuszálja, míg a mintához közeli lencse (objektívlencse) pedig az elektronnyalábot különböző szintben fókuszálja, hogy a minta felszínére legyen beállítva a fókusz.

A stigmátor, a lencserendszer asztigmatizmusa megnyilvánul, hogy az elektronnyalábnak a tárgysíkba vetítődő kerek foltja ellipszis alakúvá válik. Ilyenkor romlik a képminőség, csökken a jelintenzitás. Ez az objektív síkjában elhelyezett stigmátorral (asztigmatizmus korrekttorral) kompenzálható.

A pásztázás módja a felszín soronkénti letapogatása. Ezt egy gyors és egy lassú egymásra merőleges fűrészjel alakú rezgés összegeként lehet előállítani. A számítógépes programmal generált két fűrészjel egyidejűleg vezérli a toronyban lévő pásztázó rendszert és a képernyőre kirajzolt képpont pozícióját.

Elektronmikroszkóp használata

A felvétel készítése előtt a mintát ki kellett szárítani alkoholos oldatban illetve liofilezással (fagyasztva szárítás). A kiszárított mintát a mintakorongra ragasztottuk ezüst pasztával.

A mintakorongot rátekertük a mintatartóra, addig a magasságig, míg az megfelel a mintamagassági padnak.

A mintacserélő kamra fellevegőztetése után felcsavartuk a mintát a mintatoló rúdra és behelyeztük a mintacserélő kamrába. A kamra zárása után vákuumot vezettünk be a kamrába, hogy a mintakamra és a mintacserélő kamra nyomása kiegyensúlyozott legyen. Amikor elérte a megfelelő értéket a két kamra közötti ajtót kinyitottuk és a mintát betoltuk a helyére, majd a kamrák közötti zsilipet visszazártuk.

A minta behelyezése után a nagyfeszültség paramétereit beállítottuk és bekapcsoltuk, ezáltal az anód és katód közé rákapcsolódott a feszültség.

Beállítottuk a másodlagos elektron detektort és fókusz is. Elsőnek a nyalábbeállítást végeztük, majd a célkereszt középpontjába helyeztünk egy objektumot és középen álló képet kaptunk. Végül a stigmát is beállítottuk, hogy a mérés során végig állóképet kapjunk, ne mozogjon a képmező (asztigmia következtében sem nyúlik meg a kép).

Végül a monitoron kerestük a biofilmet a trackball mozgásával. Ha meg volt a megfelelő kép tudtunk kicsinyíteni/nagyítani rá, majd végül „pásztáztuk” és lementődött a programba.

A minta kihúzása előtt kikapcsoltuk a nagyfeszültséget és mintacserélő kamrába levegőt adtunk, miután bezártuk a zsilipet a két kamra között.

Ha a gépet már 8 órája használtuk el kellett távolítani a molekulákat, melyek a katód felületére abszorbeáltak. Ilyenkor a katódra olyan áramot jutattunk, mely felfűti és deszorbeálja a molekulákat (Tóth, 2006).



6. ábra Hitachi S4700 pásztázó elektronmikroszkóp a Szegedi Tudományegyetemen
(<http://titan.physx.u-szeged.hu> 2012)

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletünk során iparban használt műanyag és rozsdamentes acél lapocskákon lévő *Escherichia coli* és *Pseudomonas putida* biofilmet szüntettük meg fahéj, boróka és citrom illóolaj használatával.

A kísérletünk 4 részből tevődött össze:

- MIC megállapítása az illóolajoknál,
- a hatóidő megállapítása,
- biofilm képzés gátlása és
- elektronmikroszkópos felvételek.

2.1 MIC (minimális gátló koncentráció) keresése

A méréshez friss baktérium tenyészetet használtunk. Ferde agarról előző nap átoltottunk tápoldatba inokulumnyi baktériumot, melyet inkubáltunk 37°C-on 24 óra hosszáig.

LB tápoldat (*E. coli*):

- 10 g nátrium-klorid,
- 10 g kazein pepton,
- 5 g élesztő,
- 1000 ml desztillált víz.

TGE tápoldat (*P. putida*):

- 10 g glükóz,
- 5 g húspepton,
- 2,5 g élesztő,
- 1000 ml desztillált víz.

A friss baktérium tenyészet sejtszámát hígítással beállítottuk 10^6 /ml-re. A sejtszámolást Bürker-kamrában végeztük.

Az illóolaj törzsoldatot is frissen készítettük el steril, csavaros kupakú kémcsőben.

Az illóolaj törzsoldat:

- 4500 µl megfelelő tápoldat (*E. coli* - LB tápoldat, *P. putida* - TGE tápoldat),
- 500 µl illóolaj (fahéj/citrom/boróka),
- 100 µl TWEEN 40.

A TWEEN 40-t azért használtuk, mert segítette az illóolaj (olajos fázis) és a tápoldat (vizes fázis) keveredését.

A használt eszközök sterilizálása kuktában történt, a fém és üveg eszközöket 20 percig sterilizáltuk, miután a kuktában elértük a kívánt hőmérsékletet/nyomást, a műanyag eszközöket pedig 15 percig.

Steril, csavaros kupakú kémcsövekben összekevertük a baktérium tenyészetet, az illóolaj törzsoldatot és a tápoldatot (1. táblázat) és inkubáltuk 24 órán keresztül. *P. putida* esetén a kísérletek során nem volt szükséges inkubátor szekrényben hagyni az előírt ideig, mivel szobahőmérsékleten is fel tud nőni.

1. táblázat A MIC megállapításához használt összetevők mennyisége boróka és citrom illóolaj esetén

boróka és citrom illóolaj			
illóolaj koncentráció [μl/ml]	tápoldat [μl/ml]	illóolaj törzsoldat [μl/ml]	inokulum [μl/ml]
0	3900	0	100
1	3860	40	100
2	3820	80	100
4	3740	160	100
8	3580	320	100
16	3260	640	100
32	2620	1280	100
64	1340	2560	100

2. táblázat A MIC megállapításához használt összetevők mennyisége fahéj illóolaj esetén

fahéj illóolaj			
illóolaj koncentráció [μl/ml]	tápoldat [μl/ml]	illóolaj törzsoldat [μl/ml]	inokulum [μl/ml]
0	3900	0	100
0,25	3890	10	100
0,5	3880	20	100
1	3860	40	100
2	3820	80	100
4	3740	160	100

Inkubálás után értékeltük a két párhuzamos kémcsövet. Ha a kémcsövekben van zavarosodás, akkor a baktérium tudott növekedni, tehát az illóolaj nem volt hatásos. Ha a kémcsőben nem volt szemmel látható zavarosodás, akkor nem volt baktérium felnövekedés, így annál a koncentráció értéknél volt a minimális gátló koncentráció.

A MIC-et ellenőriztük, hogy statikus vagy cidikus volt-e a hatása. Amelyik koncentrációnál nem volt zavarosodás és az eggyel nagyobb koncentrációjú kémcsőből is táptalajra vittünk 0,1 ml szuszpenziót. 24 órás 37°C-on lévő inkubálás után néztük, hogy jelentek-e meg telepek a táptalajon. Ha telepek jelentek meg a MIC csak statikus volt, tehát a szaporodást állította csak le, ha nem volt telep, akkor cidikus, tehát a baktérium elpusztult az illóolaj hatása miatt. A cidikus értéket MBC-nek, minimális baktericid koncentrációnak neveztük.

2.2 Hatóidő megállapítás

A friss baktérium tenyészetet használtunk itt is, melyet előző nap megfelelő tápoldatba oltottunk át (*E. coli* –LB leves, *P. putida*- TGE leves). A friss tenyészetből kivettünk 30 ml-t és hozzáadtuk az illóolajat az MBC értékében (*E. coli*: fahéj 2, boróka 32 μl/ml; *P. putida*: boróka, citrom 64, fahéj 4 μl/ml). Az illóolaj hozzáadása előtt és utána 20, 40, 60, 120 perc elteltével mintát vettünk és tizedelő hígítási sort készítettünk, majd ezekből táptalajra szélesztettünk és megszámoltuk a telepek számát. Kerestük azt az időt, ahol jelentős/teljes a baktériumpusztulás.

2.3 Biofilm képzés gátlása

A kísérletnek ebben a fázisában rozsdamentes acél és műanyag lapocskák felületére biofilmet képeztünk, melyet illóolaj segítségével próbáltunk megszüntetni az előzőekben

megállapított hatóidő segítségével. A kísérlet során 2x2 cm-es rozsdamentes acél és műanyag lapocskákat sterilizáltunk, melyeket steril főzőpohárba helyeztünk. A biofilm egyenletes eloszlása miatt, a lapocskákat előre megszilárdított agarba (2,5%) szúrtuk bele steril csipesszel, így a lapok mindkét oldalán tudott növekedni a biofilm.

A lapokat élelmiszeripari vállalatától kaptuk, a műanyag (műanyag és szövet keveréke) lap szállítószalagból való, míg a rozsdamentes fém (króm és molibdén ötvözet) lap különböző kizsgáló gépekből származik.

A főzőpohárban lévő lapocskákhoz hozzáadtunk 50 milliliter tápoldatot és 100 µl friss baktérium szuszpenziót (7. ábra). Az elegyet inkubátor szekrénybe helyeztük 24 órára illetve 1 hétre, hogy biofilm képződjön.

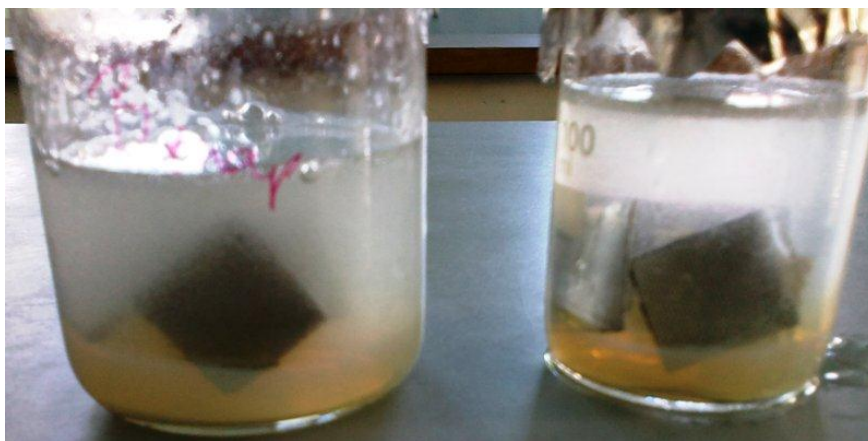


7. ábra Főzőpohárban lévő baktérium-szuszenzióban a műanyag és rozsdamentes fém lapok

A biofilm képzési idő után a lapokat kivettük steril csipesszel, majd steril vízzel leöblítettük ezután a fertőtlenítő oldatba raktuk. A steril vízzel azért öblítettük le a lapok felületét, hogy eltávolítsuk a szabad, nem a biofilmhez tartozó sejteket.

A fertőtlenítő oldat összetétele:

- illóolaj az MBC értékben (4. táblázat),
- fiziológiás sóoldat,
- tween40.



8. ábra Illóolaj tartalmú oldatban lévő lapocskák

A fertőtlenítő oldatból (8. ábra) kivettük a lapokat a hatóidő letelte után, majd ismét leöblítettük őket steril vízzel. Ezután steril mintavevő pálcá segítségével a lapocskák felületéről leszedtük a baktériumot. A steril mintavevő pálcát kézzel készítettük. A hurkapálcák végére vattából fejeket gyúrtunk, melyek alkalmasak voltak a mintavételre, ezután a lombikba helyezve és lefedve sterilizáltuk.

A mintavevő pálcát 10 ml peptonos fiziológias sóoldatba tettük, hogy a felületről leszedett baktériumok az oldatba kerüljenek.

Pepton tartalmú sóoldat összetétele:

- 1000 ml desztillált víz,
- 9 g Na Cl,
- 1 g pepton (*E. coli* esetén kazein pepton, *P. putida*- húspepton).

A peptonos sóoldat oka, hogy a baktérium ne pusztuljon el, mivel desztillált vízbe rakva megnőhet az ozmotikus nyomás és szétpukkanhat a baktérium.

A pálcákat eltörve tettük a kémcsövekbe, ott törtük el a pálcát, ahol nem értünk hozzá, ezzel is elkerülve az eredmények hiba kockázatát illetve, a minta keresztszennyezettségét. A mintavevő pálcát egy óra hosszáig hagytuk állni az oldatban (13. ábra), majd steril üvegbot segítségével kinyomkodtuk a pálcát, ezáltal a tényleges sejtszámot kaptuk.

Végül tizedelő hígítási sort készítettünk és táptalajra szélesztve néztük az élő baktérium számot 24 óra elteltével.

2.4 Elektronmikroszkópos felvételek

A műanyagra felvitt biofilm minta szárítása:

- biofilm képzése a műanyagon (1 és 5 napos)
- a minta fixálása: 2,5%-os glutáraldehidben (0,05M kakodilát puffer-7,5 p H) 2 óra hosszáig
- 50%-os EtOH oldatban 2x15 percig helyezve
- 70%-os EtOH oldatban 2x15 percig
- 80%-os EtOH oldatban 2x15 percig, a mintát egy éjszakára hűtőbe lehetett tenni 80%-os EtOH oldatban, ha nincs elég idő végigcsinálni a minta kiszáraitását egy nap alatt
- 96%-os EtOH oldatban 90 percig
- 100%-os EtOH oldatba tettük a mintát 2 óra hosszáig
- t-butil-alkohol és 100% EtOH oldat 1:2 arányba elkészítettük és a mintát 1 órahosszáig benne hagytuk
- t-bulit-alkohol : 100% EtOH 1:1 arányú oldatban a minta 1 órahosszáig
- t-bulit-alkohol : 100% EtOH 2:1, 1 óra
- abszolút t-butil-alkoholba tettük a mintát 2 órahosszáig
- liofilizáltuk (fagyasztva szárítás) a mintát a teljes kiszáradás elérése érdekében
- a mintát a mintatartóra ezüstpasztával rögzítettük
- a mintát arany membránnal vontuk be, ha az arany membrán nem állt rendelkezésünkre, akkor a mintatartót és a mintát vezető csíkkal is egybe lehetett kötni

A mintáról szárítás után 5kV gyorsító feszültségen felvételeket készítettünk a pásztázó elektronmikroszkóppal. A felvételek 2000-szeres nagyításban készültek biofilmek esetén, míg a műanyag felületéről 300-szoros nagyítású kép készült.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

3.1 Minimális gátló koncentráció

3. táblázat MIC ($\mu\text{l/ml}$) értékek

	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>
fahéj illóolaj	1	2
citrom illóolaj	>32	32
boróka illóolaj	16	32

4. táblázat MBC ($\mu\text{l/ml}$) értékek

	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>
fahéj illóolaj	2	4
citrom illóolaj	>64	64
boróka illóolaj	32	64

Az *E. coli*-nál a citrom illóolaj hatástalannak bizonyult, mert 64 $\mu\text{l/ml}$ koncentrációnál is volt zavarosodás, de itt nem az illóolaj miatt. Ezt onnan állapítottuk meg, hogy van egy jellegzetes szaga a baktériumnak és ez tisztán érezhető volt a kémcsőben.

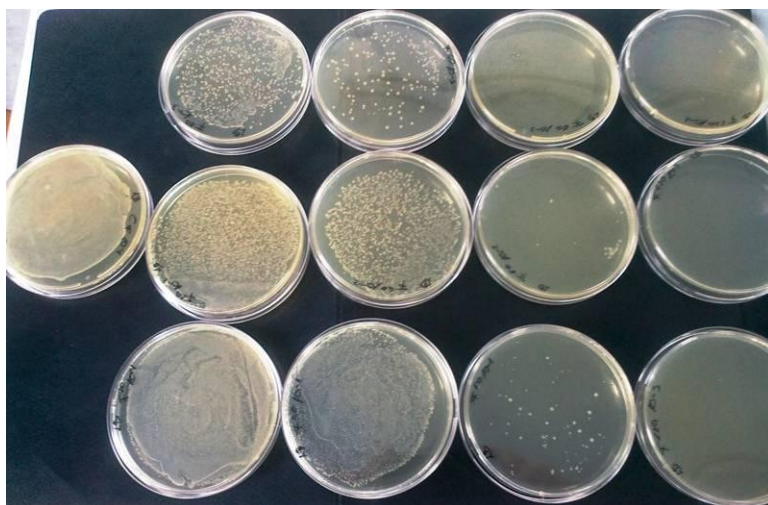
Az eredmény a táblázat (3. és 4. táblázat) adataiból jól látható, hogy a három illóolaj közül a fahéj a leghatásosabb mind az *Escherichia coli*-nál és mind a *Pseudomonas putida*-nál. A kísérletünk további részeiben az *Escherichia coli*-nál csak fahéj és boróka illóolajat használtunk, míg a *Pseudomonas putida*-nál mind a három illóolajat (fahéj, boróka, citrom).

3.2 Hatóidők

5. táblázat: *E. coli* sejtszám (cfu/ml) az MBC-vel való kezelések után az idő függvényében

Hatóidő/illóolaj	boróka	fahéj
0	$1,4 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^6$
20	$4,16 \cdot 10^6$	$5,92 \cdot 10^6$
40	$2,37 \cdot 10^6$	$1,88 \cdot 10^6$
60	$2,08 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^4$
120	$1,48 \cdot 10^6$	<10

A táblázatból (5. táblázat) is jól látható, hogy az *E. coli* boróka illóolaj hatására 120 perc elteltével a mikroorganizmusok száma egy nagyságrenddel csökkent, míg a fahéj majdnem teljes pusztulást okozott. Így a további vizsgálatok során a boróka illóolaj hatóidejére 120 percet és a fahéj hatóidőre pedig 60 percet használtunk az *E. coli*-nál.



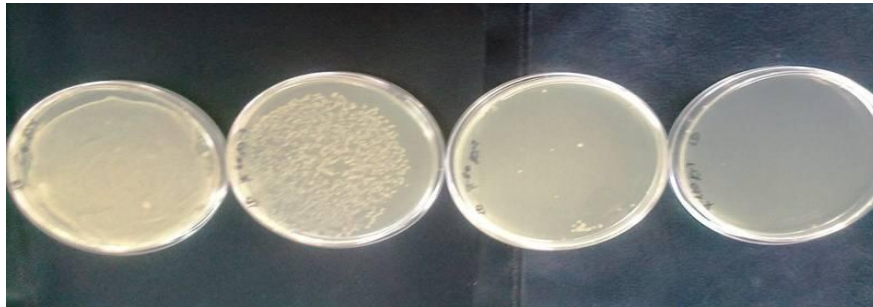
9. ábra Fahéj illóolaj hatása *E. coli*-nál: kontroll (bal szélső), 20 (első oszlop), 40 (2. o.), 60 (3.o.) és 120 (4.o) perc hatóidő utáni mikroorganizmusok számát 10-szeres (alsó sor), 100-szoros (középső s.) és 1000-szeres (felső s.) hígításnál

6. táblázat: *P. putida* sejtszám (cfu/ml) az MBC-vel való kezelés után az idő függvényében

Hatóidő (min)	boróka illóolaj	citrom illóolaj	fahéj illóolaj
0	$3,9 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^5$
20	$3 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$
40	$4 \cdot 10^2$	$7 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$
60	<10	$6 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^2$
120	<10	$5 \cdot 10^4$	<10

A táblázatból (6. táblázat) jól látható, hogy a *P. putidánál* is a fahéj illóolaj 120 perc elteltével a mikroorganizmusok száma jelentősen lecsökkent, illetve a boróka hatására már 60 perc után észlelhető volt a teljes baktériumpusztulás. Ezzel ellentétben a citrom illóolaj hatására nem egészen egy nagyságrenddel csökkent a baktérium sejtszáma. Az eredmények alapján a *P. putidánál* az illóolajok hatóideje 40 perc volt. Mivel a fahéj és boróka illóolaj hatására 40 perc hatóidő után két nagyságrenddel csökkent a sejtszám illetve a citrom esetén nem történt nagyságrendi csökkenés, így emellett az idő mellett döntöttünk a *P. putida* esetén.

A biofilm képzést gátló kísérlet során a szabad sejteknél tapasztalt időket és ezeknek a dupláját használtuk, mivel a biofilmnél a sejtek egy mátrixban vannak, így több idő kellett, hogy az illóolaj kifejtsse hatását.



10. ábra Fahéj illóolaj hatása: kontroll, 20, 40, 60 perc után *P. putida*-nál

3.3 Biofilm gátlása

7. táblázat *E. coli* 1 napos biofilm sejtszáma (cfu/ml) a szabad sejteknél tapasztalt hatóidő után:

	1 nap		
	kontroll	fahéj illóolaj	boróka illóolaj
Műanyag	$9,6 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$
rozsdamentes fém	$8,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$

8. táblázat *E. coli* 7 napos biofilm sejtszáma (cfu/ml) a szabad sejteknél tapasztalt hatóidő után

	7nap		
	kontroll	fahéj illóolaj	boróka illóolaj
Műanyag	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$
rozsdamentes fém	$7,6 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$

A táblázatban (7. és 8. táblázat) látható eredményekből megállapítható, hogy van hatás. Az 1 napos biofilm esetén a fahéj volt hatásosabb, míg a 7 napos biofilm esetén a boróka illóolaj volt hatásosabb a szabad sejteknél tapasztalt hatóidő alkalmazása során.

9. táblázat: *E. coli* 1 napos biofilm sejtszáma (cfu/ml) a hatóidő duplázása után (fahéj 120 min, boróka 240 min):

	1 nap		
	kontroll	fahéj illóolaj	boróka illóolaj
Műanyag	$1,6 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^1$
rozsdamentes fém	$1,04 \cdot 10^4$	<10	<10

10. táblázat *E. coli* 7 napos biofilm sejtszáma (cfu/ml) a hatóidő duplázása után (fahéj 120 min, boróka 240 min):

	7 nap		
	kontroll	fahéj illóolaj	boróka illóolaj
Műanyag	$8 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$
rozsdamentes fém	$2 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$

A dupla hatóidő alkalmazása jobb eredményeket eredményezett, mivel itt a sejtszám jelentősebben csökkent, mint az egyszeres hatóidőnél. A 7 napos biofilm megszüntetés kísérlet során a baktérium sejtszám egy nagyságrenddel csökkent, míg az egy napos biofilm esetén műanyagon kettő illetve három nagyságrenddel is csökkent a sejtszám, rozsdamentes fémen pedig négy nagyságrenddel csökkent a baktérium sejtszáma.

A 9. és 10. táblázat eredményei jól mutatják, hogy a boróka illóolaj bizonyult leghatásosabbnak a biofilm gátlás esetén mind műanyag, mind rozsdamentes acél felületen.



11. ábra Boróka (bal oldali) és fahéj (jobb oldali) illóolaj hatása *E. coli* műanyagon képzett 1 napos biofilmre. Középső csészében a kontroll minta található (hatóidő boróka esetén 240 perc, fahéj esetén 120 perc)

- 11. táblázat:** *P. putida* 1 napos biofilm sejtszáma (cfu/ml) a szabad sejteknél tapasztalt hatóidő után (40min):

	1 nap			
	kontroll	fahéj illóolaj	Boróka illóolaj	citrom illóolaj
Műanyag	$1,5 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^2$	$4,5 \cdot 10^2$
rozsdamentes acél		<10	<10	$8 \cdot 10^1$

- 12. táblázat** *P. putida* 7 napos biofilm sejtszáma (cfu/ml) a szabad sejteknél tapasztalt hatóidő után (40min):

	7 nap			
	kontroll	fahéj illóolaj	boróka illóolaj	citrom illóolaj
Műanyag	$2,89 \cdot 10^3$	<10	$3 \cdot 10^1$	$2,3 \cdot 10^2$
rozsdamentes acél		$6 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	$2,49 \cdot 10^3$

Az eredmények alapján a *Pseudomonas putida* esetén az egyszeres hatóidő esetén is volt jelentős sejtszám-csökkenés. Egy napos biofilm esetén főleg a rozsdamentes acélon, míg a hét napos biofilm esetén a fahéj illóolaj hatására három nagyságrenddel csökkent a sejtszám.

Elmondható a 11. és 12. táblázat adatai alapján, hogy a szabad sejteknél tapasztalt hatóidő alapján a biofilm gátlásnál a fahéj illóolaj bizonyult leghatásosabbnak.

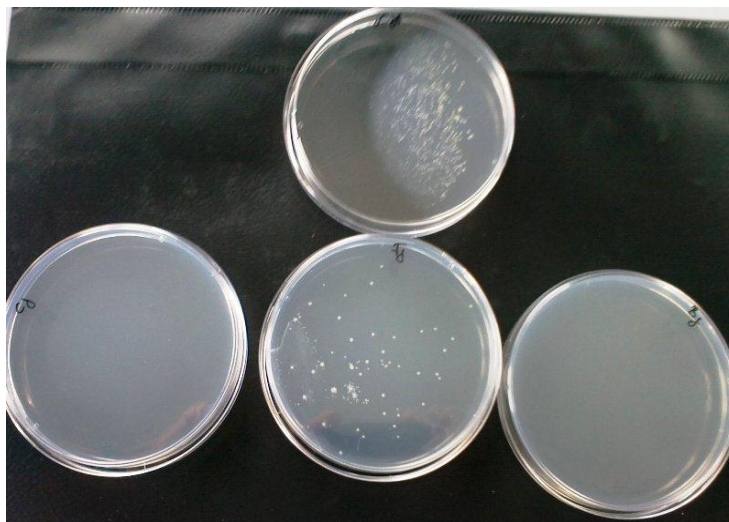
- 13. táblázat** *P.putida* 1 napos biofilm sejtszáma (cfu/ml) a hatóidő kétszeresénél (80min):

	1 nap			
	kontroll	fahéj illóolaj	boróka illóolaj	citrom illóolaj
Műanyag	$3 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	$9 \cdot 10^3$
rozsdamentes acél	$3,5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^2$	<10	<10

- 14. táblázat** *P. putida* 7 napos biofilm sejtszáma (cfu/ml) a hatóidő kétszeresénél (80min):

	7 nap			
	kontroll	fahéj illóolaj	boróka illóolaj	citrom illóolaj
Műanyag	$1,0 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
rozsdamentes acél	$1,0 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$

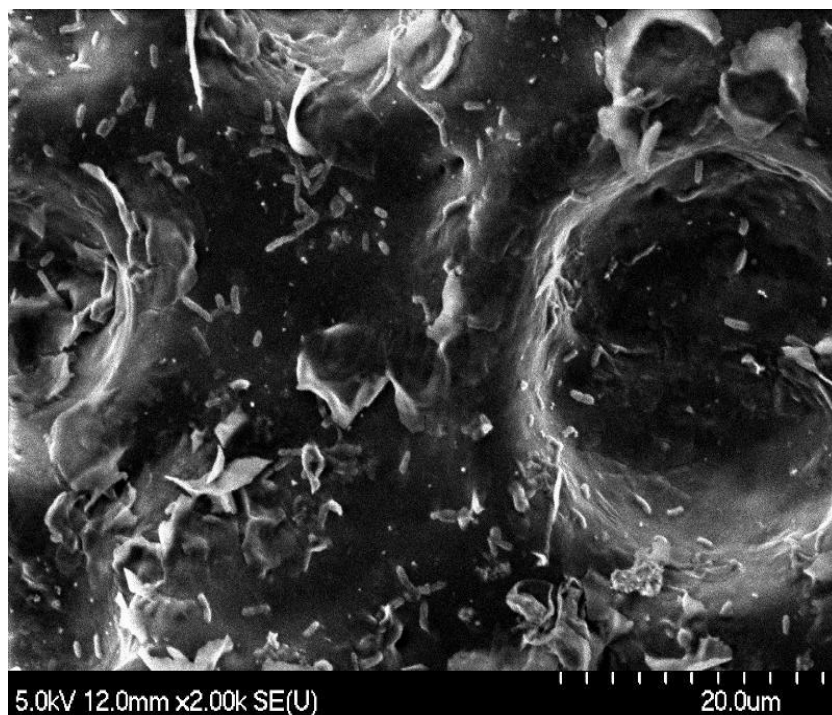
A biofilm képzésre jelentős hatása volt a hatóidő duplázásának. A 13. és 14. táblázat adataiból jól látható, hogy a műanyag felületen az 1 és 7 napos biofilm esetén a boróka illóolaj bizonyult leghatásosabbnak. Míg a rozsdamentes acél felületén 1 napos biofilm esetén boróka és a citrom illóolaj, 7 napos biofilm esetén pedig a fahéj és a boróka illóolaj volt leghatásosabb. A citrom illóolaj ennél az egy kísérletnél bizonyult csak eléggé hatásos szernek, mivel a sejtszámot az 1 napos biofilmnél három nagyságrenddel csökkentette rozsdamentes acél felületen *Pseudomonas putida* esetén.



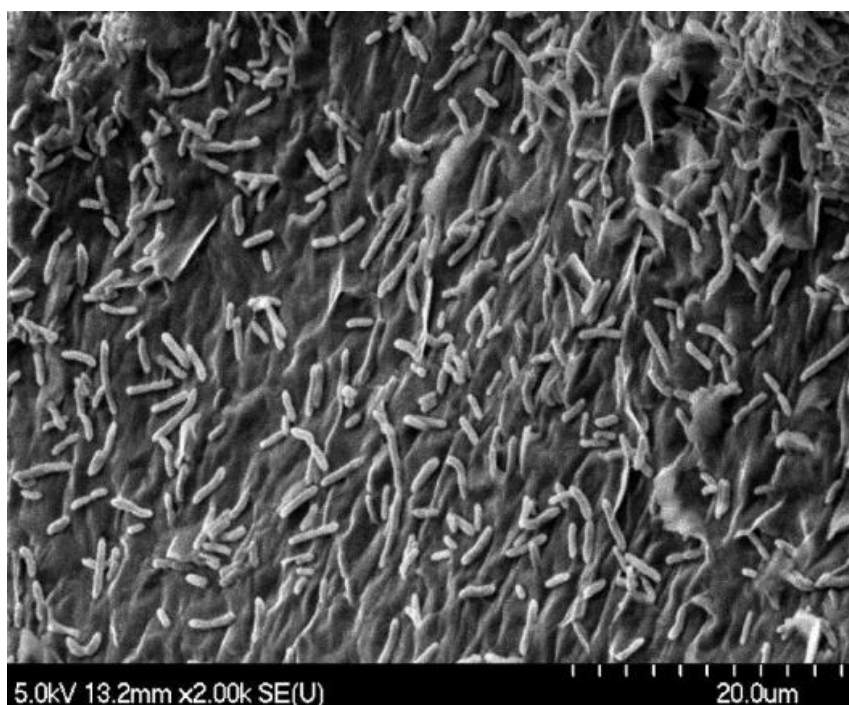
12. ábra Citrom, fahéj és boróka illóolaj hatása *P. putida* rozsdamentes acélon képzett 1 napos biofilmre (alsó sor) 80 perces hatóidő után (felső sorban a kontrol minta)

A kísérletünket összehasonlítottuk egy hasonló kutatással, ahol ugyanúgy iparban használatos rozsdamentes acél felületen képeztek biofilmet. A kutatásuk során citromfű illóolaj segítségével távolították el a *Listeria monocytogenes* biofilmet. A 3 órás biofilm esetén a 15 perces hatóidő után 40,28%-os volt a sejtszám csökkenés, 60 perces hatóidő után pedig 44,58%-os volt. A 240 órás biofilm esetén a csökkenés 26,59%-os volt 15 perc hatóidőnél, míg 60 percnél 72,51%-os volt a *L. monocytogenes* sejtszám csökkenése (de Oliveira et al., 2010). A mi kísérleteink során az 1 (24 h) és 7 napos (168 h) *P. putida* biofilm esetén 80 perces kezelési idő során a sejtszám 99%-os csökkenése következett be. Egy napos *E. coli* biofilm esetén is 99% körüli a csökkenés, addig a 7 napos biofilmnél a fahéj illóolaj hatására (120 perc) 62,5%-os volt az *E. coli* sejtszám csökkenés, míg a boróka illóolaj (240min) hatására 87%-os volt.

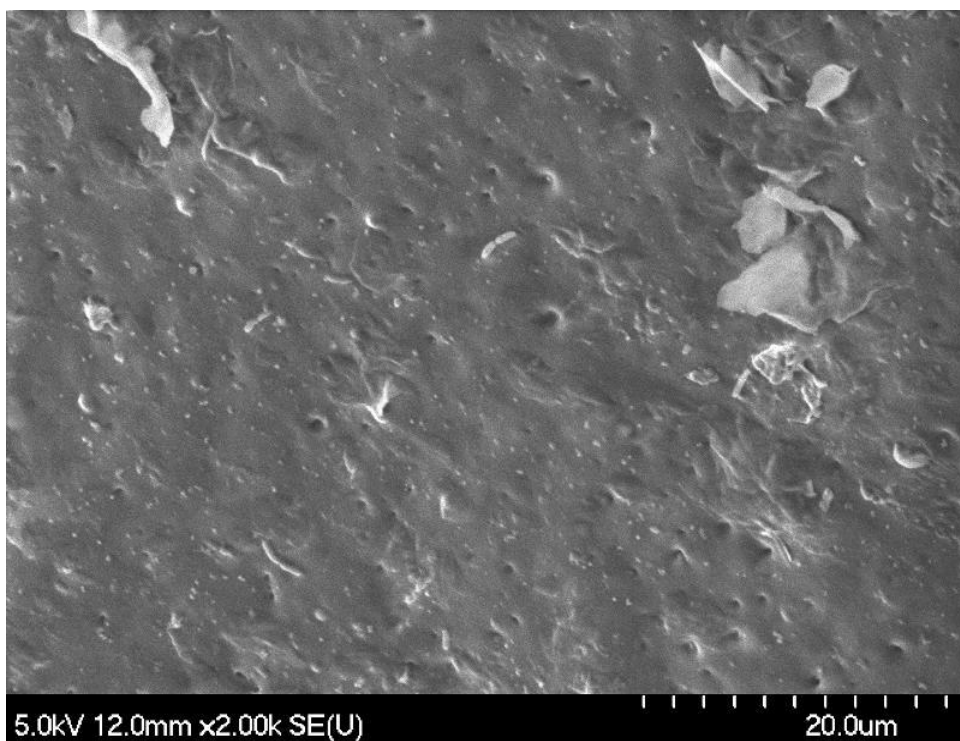
3.4 Elektronmikroszkópos felvételek



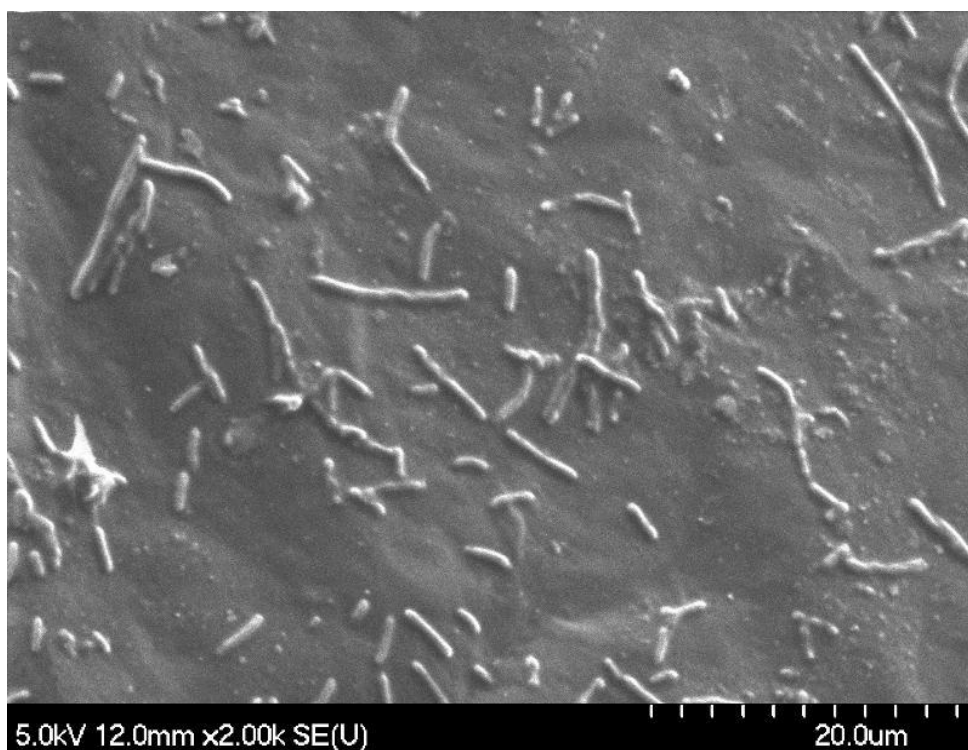
13. ábra 1 napos *Pseudomonas putida* biofilm



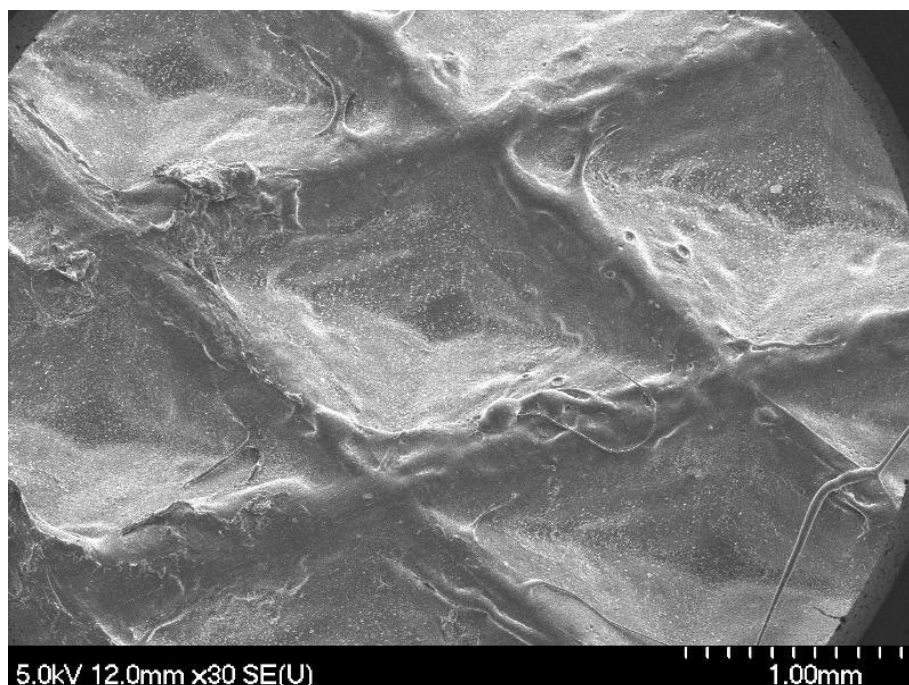
14. ábra *Pseudomonas putida* 5 napos biofilm



15. ábra *E. coli* 1 napos biofilm



16. ábra *E. coli* 5 napos biofilm



17. ábra A műanyag felszíne

A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint egy nap után találhatók megtapadt sejtek a műanyag felületen. Az ötödik napon a sejtek száma jelentősen megnövekedett, és már láthatók a kialakuló mikrotelepek a közöttük levő ragasztóanyaggal együtt (14. ábra jobb és bal felső sarok). Feltételezhetően a minta előkészítés károsította némileg a műanyag felületet, és a leváló felülettel a biofilm egy része is leszakadt.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitűzésünk volt a baktérium biofilmek ellen használható, természetes eredetű antimikrobiális hatóanyagok kipróbálása. Erre a célra fahéj, boróka és citrom illóolajt választottunk. A kiválasztott illóolajokat kipróbáltuk az élelmiszeriparban használatos műanyag és rozsdamentes acél felületen lévő *E. coli* és *P. putida* biofilmek kezelésére.

A biofilmek nagy gondot tudnak okozni az élelmiszeriparban, mivel megnő a mikrobiológiai kockázat, ezáltal nagyobb az esélye a különböző élelmiszereredetű megbetegedéseknek, másrészt pedig a technológia hatásosságát is csökkentik, a szűrők eltömődésével, a berendezések hatásának csökkentésével és a korrózió kialakulásához való hozzájárulással. A rezisztens mikroorganizmusok képesek takarítás után a felületeken megtapadva maradni, így a készterméket fertőzni a következő gyártás során.

Munkánk során megkerestük a minimális baktericid koncentrációt az egyes baktériumokra (2 – 64 µl/ml), és a biofilmek kezelésénél ezt a koncentrációt alkalmaztuk.

A hatóidő a másik lényeges tényező az illóolaj koncentrációja mellett. Elég-e a szabad sejteknél tapasztalt idő vagy célszerű a hatóidőt duplázni/négyszerezni a biofilm ellenálló képessége miatt. Az eredményekből jól látható, hogy a hatóidőnek minimum kétszeresének kell lenni, mint amit a szabad sejteknél tapasztaltunk, mivel így nagyobb baktérium szám csökkenést érhetünk el.

A munkánk eredménye, hogy volt hatása az illóolajoknak a biofilmekre. Főként a boróka illóolaj hatott legtöbb esetben, a mikrobaszám kettő illetve három nagyságrenddel való csökkentésével, de a fahéj illóolaj hatása sem elhanyagolható.

A javaslatunk, hogy ezt a kutatást ki kell terjeszteni több mikroorganizmusra, ezáltal egy új lehetőségeket kidolgozni, melyeket széles körben lehetne alkalmazni az élelmiszeriparban. A jövőbeni munkánk céljai között szerepel illóolaj keverékek hatását vizsgálni a különböző mikroorganizmusokra. Kérdéses az illóolaj keverékben a két illóolaj egymásra gyakorolt hatása, azaz egymás hatását erősítik vagy gyengítik.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- Ádám É. (2006): *Mikrobiológia gyógyszerész- és fogorvostan-hallgatóknak*, Semmelweis Kiadó, 149-151., 157-158.
- Bakkali, F. Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Bassler, BL. (1999): How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing: *Current Opinion in Microbiology*, 2:582–587.
- Burt S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3), 223–253.
- Csapó J. - Csapóné K. Zs. (2003): *Élelmiszer-kémia*. Mezőgazda Kiadó 292-294.
- Davidson, PM. and Harrison, MA. (2002): Scientific Status Summary: Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers and other process control. *Food Technology* 56(11), 69-78
- Dr. Szabó Z., Dr. Csury I., Dr. Hidegkuti Gy. (1987): *Élelmiszeripari műveletek és gépek*, Mezőgazdasági Kiadó, 357-358.
- Jun, W., Kim, MS., Cho, B-K., Millner, PD., Chao, K., Chan, DE. (2010): Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. *Journal of Food Engineering* 99, 314-322.
- Krisch J. (2012): *Növényi hatóanyagok*. Oktatási segédanyag.
- Kumar CG., Anand, SK. (1998): Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1–2), 9–27.
- Laczy P. (2008): *Élelmiszer-higiéna, Élelmiszerlánc-biztonság*, Mezőgazda Kiadó, 9, 107.
- Monroe D (2007): Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLOS Biology* 5 (11): 307
- Moreire M.R. , Ponce, A.G., del Valle, C.E., Roura, S.I.: Inhibitory parameters of essential oil to reduce a foodborne pathogen: *LWT-Food Science and Technology*, 38, 565-570.
- de Oliveira, MMM., Brugnara, DF., Cardoso, MdG., Alves, E., Piccoli, RH. (2010): Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control* 21, 549-553
- Packiavathy, IASV., Agilandswari, P., Musthafa, KI., Pandian SK., Ravi, AW. (2012): Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International*, 45: 85–92.
- Shia X., Zhua, X. (2009): Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 407–413.

Simoes, M., Simoes, LC., Vieira, MJ. (2009): A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 43, 573-583.

Solórzano-Santos, F., Guadalupe, M., Novales, M. (2012): Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23(2), 136–141.

Tóth Zs. (2006): A Hitachi S4700 pásztázó elektronmikroszkóp bemutatása, és kezelési útmutatója

Van Houdt, R. and Michiels, CV. (2010): Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface Review article. *Journal of Applied Microbiology*; 109 (4):1117-31.

Whitehead, NA., Barnard AML., Slater H., Simpson, NJL., Salmond, GPC. (2001): Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 365-404.

<http://aok.pte.hu/bioanal/grants/qs/> 2012. 04.10.

http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_putida 2012.09.03.

<http://hu.wikipedia.org/wiki/Brown-mozg%C3%A1s> 2012.08.13

<http://aromax.hu/hu/termekcink/reszletek/borokaolaj/>

<http://aromax.hu/hu/termekcink/reszletek/fahejolaj/>

<http://aromax.hu/hu/termekcink/reszletek/citromolaj/>

Internetről átvett képek jegyzéke:

http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/antibiotikum%20rezisztencia_0.jpg 2012. 10. 01.

<http://lawrencekok.blogspot.hu/2011/05/ib-biology-on-microbes-biotechnology.html> 2012.03.19.

<http://titan.physx.u-szeged.hu/~lamilab/hitachi.htm> 2012. 09. 25.