

# **Illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálata *in vitro* módszerekkel**

Doktori (PhD) értekezés



**Balázs Viktória Lilla**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Deli József

Témavezető: **Dr. Horváth Györgyi**

Társtémavezető: **Dr. Krisch Judit**

Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT, Pécs

2022

## Tartalomjegyzék

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	1
<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	2
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	5
2.1. A bakteriális légúti megbetegedések jellegzetességei .....	5
2.2. A bakteriális biofilmek jelentősége .....	7
2.2.1. A bakteriális biofilmek kialakulása .....	9
2.2.2. A bakteriális biofilmek felépítése .....	11
2.2.3. A quorum sensing (QS) mechanizmus .....	14
2.2.4. A bakteriális biofilmek által okozott egészségügyi problémák .....	15
2.3. Az illóolajok általános jellemzése .....	20
2.3.1. A borsmenta illóolaj .....	21
2.3.2. A fahéjkéreg illóolaj .....	22
2.3.3. A kakukkfű illóolaj .....	23
2.3.4. A szegfűszeg illóolaj .....	24
2.3.5. Illóolajok antibakteriális hatása .....	25
2.4. A vizsgálatba bevont léguti patogének jellemzése .....	29
2.4.1. <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> .....	29
2.4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
2.4.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. mutans</i> .....	32
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	35
3.1. A vizsgálatokban felhasznált illóolajminták .....	35
3.2. Illóolajok kémiai összetételének meghatározása .....	35
3.3. Mikrobiológiai vizsgálatok .....	36
3.3.1. Bioautográfiás vizsgálatok .....	37
3.3.2. Minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása .....	39
3.3.3. Pickering-emulziók előállítása .....	40
3.3.4. Illóolajok és komponenseik biofilm-képződésre kifejtett hatásának vizsgálata .....	40
3.3.5. Biofilmek vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével .....	41
3.3.6. A quorum sensing (QS) mechanizmus vizsgálata .....	41
<b>4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK</b> .....	43
4.1. A vizsgált illóolajok kémiai analízise .....	43
4.2. Bioautográfiás vizsgálatok eredményei .....	46

4.3. MIC értékek meghatározásának eredményei .....	51
4.4. Az illóolajok biofilm gátló hatásának eredményei .....	53
4.5. A SEM vizsgálat eredményei .....	59
4.6. A QS mechanizmus vizsgálatának eredményei.....	63
<b>5. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>65</b>
<b>6. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>68</b>
<b>7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>95</b>
<b>8. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK.....</b>	<b>95</b>
8.1. Az értekezés alapját képező publikációk .....	96
8.2. Egyéb publikációk .....	98
<b>9. MELLÉKLETEK.....</b>	<b>106</b>

## **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

**ATCC:** American Type Culture Collection (amerikai típustörzs gyűjtemény)

**BHI:** brain heart infusion (agy-szív tápoldat)

**CFU:** colony forming unit (telepképző egységek száma)

**GC-MS:** gas chromatography-mass spectrometry (gázkromatográfiás analízis tömegspektrometriás detektálással)

**GC-FID:** gas chromatography-flame ionization detector (gázkromatográfiás analízis lángionizációs detektálással)

**DSM:** German Collection of Microorganisms (német törzstípus gyűjtemény)

**MIC:** minimal inhibition concentration (minimális gátló koncentráció)

**MTT:** 3-[4,5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólium-bromid

**Rf:** retenciófaktor

**t<sub>R</sub>:** retencióidő

**SZMC:** Szeged Microbiological Collection

**QS:** quorum sensing

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az antibiotikum-rezisztencia, amely többek között összefüggésben van a baktériumok biofilmképző sajátosságával, napjainkban rendkívül sok problémát okoz az egészségügyben. A legtöbb krónikus fertőzés hátterében az áll, hogy a baktériumok biofilmbe rendeződve sokkal ellenállóbbak a kedvezőtlen környezeti hatásokkal szemben, így a fertőtlenítőszer, antibiotikumok nem alkalmasak a visszaszorításukra. Ennek kiküszöbölése érdekében szükség van új, hatékony szerek kutatására. Az illóolajok antibakteriális hatása régóta ismert, ám ahhoz, hogy kellő biztonsággal alkalmazhassuk őket, elengedhetetlen hatásmechanizmusuk alapos vizsgálata, az antibakteriális hatáshoz szükséges dózisuk pontos meghatározása, és ezek igazolása megfelelő mikrobiológiai vizsgálatokkal. Kutatásunk során célul tűztük ki, hogy alátámasszuk négy illóolaj (a borsmenta, a fahéjkéreg, a kakukkfű, és a szegfűszeg), és főkomponenseik (a mentol, a fahéjaldehid, a timol, és az eugenol) antibakteriális, valamint biofilm képződést gátló hatását légúti megbetegedéseket okozó baktériumtörzsekkel szemben. Fontos megemlíteni, hogy az eddig megjelent publikációk többségében nem légúti patogének ellen vizsgálták az illóolajok és komponenseik antibakteriális hatását. A bakteriális légúti megbetegedések jelentős térhódítását leginkább az antibiotikum-rezisztencia terjedése, valamint a bakteriális biofilmek kialakulása eredményezi. A baktériumok biofilmbe rendeződve sokkal ellenállóbbak a kedvezőtlen környezeti tényezőkkel szemben, pl. a fertőtlenítőszerekkel, antibiotikumokkal szemben, a pH kedvezőtlen változását és a hőmérsékleti tényezők szélsőséges ingadozását is jobban „kivédik” ily módon. A biofilm egy olyan védelmi struktúra, amely a baktériumsejteket körülvevő olyan mechanikus és funkcionális barriert képez, amely nehezen erradikálható a jelenleg alkalmazott terápiás lehetőségekkel (pl. antibiotikum adásával). Mindemellett a biofilmképződés az antibiotikum-rezisztencia kialakulását nagymértékben segíti, hiszen a biofilmet áttörő antibakteriális szerek mindössze arra elegendők, hogy rezisztenciát alakítson ki vele szemben az adott törzs. A tények azt mutatják, hogy a krónikus betegségek kialakulásának hátterében a fent említett tényezők állnak (Singh et al., 2017). Ebből következően elengedhetetlenül fontos a szintetikus hatóanyagok mellett a természetes anyagokat is vizsgálni, amelyek lehetővé teszik a bakteriális biofilmek képződésének megelőzését és/vagy visszaszorítását. A növényi illóolajok alkalmazása nem újkeletű, hiszen már a középkor óta széles körben használják őket. Ezért alkalmasnak bizonyultak járványok elleni védekezésben, használták őket láz, fejfájás és köhögés csillapítására, sőt a vallási életben is fontos szerepet töltöttek be (Burt, 2004). Napjainkban az illóolajok iránti érdeklődés újra reneszánszát éli, hiszen egyre többen fordulnak

a természetes anyagok használata felé. Azonban ahhoz, hogy az illóolajokat kellő hatékonysággal és biztonsággal lehessen használni, nélkülözhetetlen az élő sejtre, szervezetre gyakorolt hatásuknak alapos megismerése.

A fenti tények alapján vizsgálataink során a borsmenta, a fahéjkéreg, a kakukkfű és a szegfűszeg illóolajok antibakteriális, valamint biofilm képződésre gyakorolt hatására fókuszáltunk *in vitro* mikrobiológiai módszerek segítségével. Az illóolajokat egyrészt gyakori használatuk miatt, másrészt a PTE GYTK Farmakognóziái Intézet Illóolaj Kutatócsoportjának előzetes vizsgálati eredményei alapján választottuk ki (Ács et al., 2018). Mivel az illóolajok lipofil karakterűek, ezért olyan technológiai fejlesztéseket is végeztünk, amelyekkel az illóolajok biohasznosulása, biológiai hatása javítható. A mikrobiológiai vizsgálatokba legúti baktériumokat vontunk be. Kísérleti eredményeink megfelelő alapot biztosíthatnak az illóolajok antibakteriális szerként való alkalmazásához

Munkánk elején az alábbi célok kerültek megfogalmazásra:

- Az általunk vizsgált illóolaj minták (borsmenta, fahéjkéreg, kakukkfű, szegfűszeg) összetételének meghatározása GC-MS (gázkromatográfia-tömegspektrometria), GC-FID (lángionizációs detektorral kapcsolt gázkromatográfia) technikákkal.
- Az illóolajok és komponenseik antibakteriális hatásának vizsgálata direkt bioautográfias rendszerben. Mivel különleges tápanyagigényű baktériumok is részét képezték a kutatásunknak, így ennek a módszernek az optimalizálására is szükség volt.
- Preparatív rétegekromatográfia kivitelezése annak érdekében, hogy pontosan meghatározzuk, mely illóolaj komponensek tehetők felelőssé az antibakteriális hatásért.
- A vizsgált illóolaj minták minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása mikrodilúciós rendszerben a vizsgálatokba bevont tesztbaktériumok ellen.
- A négy leggyakrabban alkalmazott és vizsgálatainkba bevont illóolaj (borsmenta, fahéjkéreg, kakukkfű, szegfűszeg) biofilm képződésre gyakorolt hatásának tanulmányozása .

- Mivel az illóolajok lipofil karakterűek, vizes bázisú bakteriális rendszerekben vizsgálatuk nehézségbe ütközik. Ezért a jobb biohasznosulás érdekében, az illóolaj mintáink nanotechnológiai formulálása is célunk volt.
- A nanotechnológiai módszerrel becsomagolt (Pickering-emulziós) és az alkoholos valamint Tween segédanyaggal készült illóolaj minták biofilm képződésre kifejtett hatásának összehasonlítása.
- A baktériumok quorum sensing rendszereken keresztül képesek kommunikálni egymással, így segítve elő az ellenállóképességük fokozását. Céljaink közt szerepelt az illóolajaink anti-quorum sensing hatásának tesztelése.
- Scanning elektromikroszkópos felvételek készítése, annak érdekében, hogy egyértelműen megállapítható legyen az illóolaj minták biofilm képződésre gyakorolt hatása.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A bakteriális légúti megbetegedések jellegzetességei

A humán légutak két részre oszthatók: a felső légutakra, beleértve a szájüreget, a mandulákat, a gégét és az orrgaratot, valamint az alsó légutakra, amely a légsövet, a hörgőket és a tüdőleányeket foglalja magába (Rytter et al., 2020). A felső légutakba bejutó baktériumok nagy része nem okoz fertőzést, azonban, mint kockázati tényezők hozzájárulhatnak a patogének elterjedéséhez és különböző szövődmények kialakulásához (Bogaert et al., 2004; Deák, 2013). A felső légutak számos fontos fiziológiai funkciót látnak el, mint például a belélegzett levegő szűrését, melegítését és párásítását (Jones et al., 2001; Kumpitsch et al., 2019). Az alsó légutak állandó saját flórával nem rendelkeznek (Deák, 2013), de hajlamosító tényező esetén baktériumok és más mikrobák megtelepedési pontjává válhatnak, ezért jelentős klinikai következmények kialakulásáért lehetnek felelősek (Rali et al., 2016). Egyes hajlamosító és / vagy kockázati tényezők hozzájárulnak különböző fertőzések kialakulásához. Ezek közé tartozik az életkor, az immunológiai állapot, és a különböző környezeti hatások (Miyashita et al., 2018; Soodaeva et al., 2020). A légutakban leggyakrabban előforduló baktériumok a következők: *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, továbbá *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia trachomatis* valamint *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces israelii*, *Yersinia pestis*, végül *Francisella tularensis* és *Bacillus anthracis* (Costello et al., 2009; Bassis et al., 2014; Shilts et al., 2016; Stearns et al., 2015; Rytter et al., 2020). Fontos kiemelni, hogy a légutakba került baktériumok nem feltétlenül a kolonizált területen okoznak problémát, hanem a légutak egyéb területeire vagy a légutaktól független szervekbe is eljuthatnak, helyi gyulladást indukálva. A *S. pneumoniae*, a *Neisseria meningitidis*, a *H. influenzae* és a *H. parainfluenzae* leggyakrabban a garatban és az orrgaratban figyelhető meg, de a *S. pneumoniae*, és a *Haemophilus* nemzetség tagjai gyulladást a középfülben okoznak, a *N. meningitidis* pedig a véráram útján a központi idegrendszerbe jutva agyhártyagyulladást okoz (Deák, 2013). A légutakban kialakuló kórképek leggyakoribb bakteriális patogénjeit az 1. táblázat foglalja össze (Abreu et al., 2012; Deák, 2013; Coburn et al., 2015; Kumpitsch et al., 2019; Rytter et al., 2020).



1. táblázat: A légutakban kialakuló kórképek leggyakoribb bakteriális patogénjei

	Kórkép	Baktériumok
Felső légutak	Otitis media – középfülgyulladás	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>M. catharrhalis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	Sinusitis - arcüreggyulladás	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>M. catharrhalis</i> , <i>S. aureus</i>
	Pharyngitis - garatgyulladás	<i>S. pyogenes</i>
	Tonsillitis - mandulagyulladás	<i>S. pyogenes</i> , <i>C. diphtheria</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i>
	Laryngitis - gégegyulladás	<i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. catharrhalis</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Alsó légutak	Bronchitis - hörghurut	<i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catharrhalis</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>L. pneumophila</i>
	Pneumonia - tüdőgyulladás	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. burnetii</i> , <i>Chlamydia sp.</i>

A léguti bakteriális fertőzések visszaszorítása érdekében antibiotikummal történő kezelés a legelterjedtebb megoldás. Ám az antibiotikum túlhasználatnak köszönhetően egyre több multirezisztens baktériumtörzs jelent meg (GBD, 2016; WHO, 2019; Rytter et al., 2020). Fontos megemlíteni, hogy a léguti fertőzések leggyakrabban virális eredetűek. Ennek ellenére elterjedt jelenség bármely eredetű léguti megbetegedés kezelésére antibiotikum kúra javaslása. Az antibiotikum-rezisztencia elterjedésének hátterében az antibiotikum túlhasználat mellett, azok indokolatlan alkalmazása áll. Indokolt esetben, bakteriális fertőzés esetén a következő antibiotikum kezelések javasoltak. A torok és/vagy mandulagyulladást legtöbb esetben *S. pyogenes* eredményezi, célszerű orális, illetve parenterális  $\beta$ -laktám antibiotikum 10 napig tartó kezelését javasolni.  $\beta$ -laktám allergia esetén kiválthatók makrolidok alkalmazásával. Az antibakteriális kezelés elmulasztása jelentősen növeli az úgynevezett post-streptococcalis szövődmények, azaz a *Streptococcus sp.* által eredményezett felülfertőződés kialakulásának veszélyét. A bakteriális középfülgyulladások kezelésében elsősorban az amoxicillint részesítik

előnyben, bár sok esetben a fertőzésben részt vevő törzsek rezisztenciát mutatnak. A kezelés általában hatásos még mérsékelt  $\beta$ -laktám rezisztens *Pneumococcus* törzsek esetén is, de nem hat a  $\beta$ -laktamáz termelő *Haemophilus* törzsekre. A krónikus otitis média, sinusitis esetek kezelése sokkal nehezebb, nem ritkán igényel üregi átöblítést, sebészi beavatkozást. Közösségben szerzett, egészséges páciens tüdőgyulladás esetén elsősorban doxycyclin vagy azythromycin, clarythromycin ajánlott. Abban az esetben, ha egyéb betegségek is jelen vannak (pl. krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), diabetes) moxifloxacin, levofloxacin a javasolt, amennyiben a beteg állapota hospitalizációt indokol. Aspirációs pneumonia esetén a kezelésnek mindenképpen ki kell terjednie az anaerob mikrobák irányába, amire a clindamycin a legalkalmasabb. A kórházban szerzett tüdőgyulladások kezelése, a gyakori antibiotikum-rezisztencia miatt gyakran nehézségekbe ütközik. Tüdőgyulladás terápia esetén javasolt antibiotikum csoportok: tetracyclinek, makrolidok, 4. generációs fluorokinolonok (Deák, 2013). Az antibiotikumok túlzott használata számos rezisztens baktériumtörzs megjelenését eredményezte (Ginat, 2015; Kumpitsch et al., 2019; Rytter et al., 2020).

## 2.2. A bakteriális biofilmek jelentősége

A mikrobiális biofilm nem más, mint mikrobasejtek összessége, amelyet saját maguk által termelt polimer mátrix vesz körül. A biofilmeket létrehozhatják baktériumok, vírusok, gombák, akár monomer, akár polimer kultúraként. A biofilmek közös jellemzője, hogy erősen kötődnek a felülethez, amelyen megtapadtak. Gyakorlatilag bármilyen felületen megfigyelhetők, műanyagok, kavicsok felszínén, lefolyóban, továbbá humán szervezetben nyálkahártyán gyakran, szövetekben, váladékban ritkábban (Costerton et al., 1981; Costerton et al., 1987; Costerton et al., 1999; Hoiby, 2017; Vestby et al., 2020). A bakteriális biofilmek kezdetleges vizsgálata az 1700-as évekig nyúlik vissza. Anthony van Leeuwenhoek 1683-ban leírta, hogy bizonyos mikrobiális egységek képesek hártát képezni (Dobell, 1960; Hoiby, 2014; Hoiby, 2017), később Louis Pasteur már megfigyelte azt is, hogy a baktériumok csoportokba rendeződve összeállt egységeket, azaz aggregátumokat alkotnak (Pasteur, 1864). A baktériumok biofilm vizsgálata az 1970-es évekig nem volt népszerű. Ezt követően Nils Hoiby összefüggést vélte felfedezni a tartós fertőzések és a baktériumok biofilm közössége között. Így nyilvánvalóvá vált, hogy a bakteriális biofilm számos klinikai kórkép kialakításában vesz részt, különösen a krónikus fertőzésekben van szerepe (Hoiby & Axelsen, 1973; Hoiby,

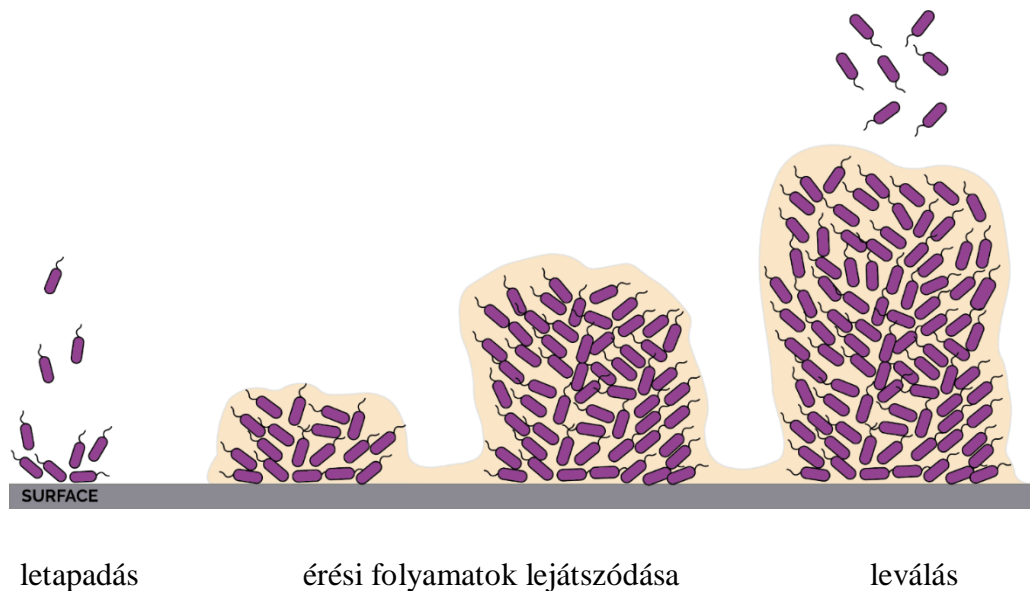
1974; Costerton et al., 1999; Bjarnsholt et al., 2009; Stoodley et al., 2009; Bjarnsholt, 2013; Hoiby, 2017). Az első bizonyíték a bakteriális biofilmek jelenlétére, egy *P. aeruginosa* bakteriális biofilmről készült elektromikroszkópos fotó volt (Hoiby, 1977).

Az első tanulmány, amely összefüggést állapított meg a bakteriális fertőzések legyőzése, valamint a biofilmképző képesség között 1985-ben jelent meg. Ekkor már vizsgálatok irányultak a biofilmek struktúrájának és biológiájának megismerésére, az antibiotikum-rezisztencia és a biofilm jelenléte közti kapcsolatra, a planktonikus formákhoz képest megfigyelhető ellenállóképesség fokozódására (Nickel et al., 1985). Costerton munkásságának jelentősége vitathatatlan, hiszen ő volt az, aki felismerte a biofilmek jelentőségét, a biofilmek által eredményezett egészségügyi problémákat, valamint a bakteriális biofilmek eredményeképpen kialakuló kórképek kezelésének nehézségeit. Ennek érelmében 1996-ban megszervezte az első biofilm témájú előadásokat és kutatásokat bemutató konferenciát (ASM Biofilm Conference, Snowbird, Utah, USA, 1996), amely során együttműködéseket kezdeményezett számos orvos és mikrobiológus kutatóval. Így egyre több kutatócsoport kezdett el foglalkozni a bakteriális biofilmek kérdéskörével. Biofilmek nemcsak élő szervezetben (nyálkahártya felszínén, hámsejtek felszínén, szövetstruktúrákba ágyazódva) jöhetnek létre, hanem más felületen is. Felismerték, hogy az orvosi eszközök felületén (intubálósövek, kardiovaszkuláris eszközök, ízületi protézisek, katéterek) megtapadó és biofilmbe rendeződő baktériumok a kórházi fertőzések nagy részéért felelőssé tehető (Dibartola et al., 2017). A biofilmek felderítése, működésük alapos megismerése és jelentőségük alátámasztása egyre nagyobb térhódítást nyert (Costerton et al., 1995; Bjarnsholt et al., 2012). A tudományos kutatások eszközeinek fejlődésével egyre részletesebb képet kaptak a kutatók a különböző bakteriális biofilmek működéséről (Whiteley et al., 2001; Bagge et al., 2004; Hoiby, 2017), és azok antibiotikumokkal szembeni ellenállóképességéről (Ceri et al., 1999; Wang et al., 2013). Ismertté vált, hogy a biofilm mátrixba ágyazott sejtek képesek olyan fenotípus expresszáására, amelyek nagymértékben eltérnek planktonikus formáiktól, és specifikus tulajdonságokat mutatnak, például nemcsak antibiotikum-rezisztenciát, hanem baktericid (fertőtlenítő szer) kezelésekkel szembeni fokozott ellenállást (Nett et al., 2008; Wong et al., 2010). A bakteriális biofilmek jelentőségét igazolja, hogy a European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID; Európai Klinikai Mikrobiológiai és Infektológiai Társaság) létrehozott egy Study Group for Biofilms nevű kutatási részleget. Folyamatosan zajlik a biofilmekkel kapcsolatos kutatási eredmények bemutatása a biofilmek témáját felölelő konferenciákon: Utah, 1996; Montana, 2000; Mallorca, 2007; Róma, 2009; amelyek ezt követően évente megrendezésre kerülnek (Hoiby, 2017). Így lehetővé válik a legújabb kutatási

irányvonalak gyors és hatékony ismertetése, hiszen az elmúlt 50 évben világossá vált, hogy rendkívüli hangsúlyt kell fektetni a bakteriális biofilmek megismerésére, megelőzésére, valamint visszaszorítására (Hoiby et al., 2015; Hoiby, 2017).

### 2.2.1. A bakteriális biofilmek kialakulása

A bakteriális biofilmek kialakulásának legfontosabb mechanizmusa maga a tapadási folyamat. Mind biotikus mind pedig abiotikus felületen elindulhat a biofilm képződésnek az első szakasza (O'Toole et al., 2000). A biofilmek kialakulását az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra A biofilm kialakulásának folyamata (Maunder & Welch, 2017)

Első lépésben a planktonikus sejtek tapadnak le az adott felületre, amely a különböző bakteriális függelékek (fimbria, pilus, flagellum) segítségével valósul meg (Maric & Vranes, 2007). A különböző környezeti hatások és tényezők (felület típusa, hőmérséklet, nyomás) befolyásolhatják a kitapadás folyamatát (Karatan & Watnick, 2009). Egyes esetekben a sejtfelszíni hidrofobitás is jelentős befolyásoló erővel bírhat, hiszen amikor a kitapadás egy hidrofób, nem poláros felszínen zajlik, akkor a felület és a baktériumok közötti hidrofób kölcsönhatás csökkenti a köztük lévő taszító erőt (Tribedi & Sil, 2014). A felülethez történő

tapadás kapcsán fellépő fizikai hatások közé a van der Waals kölcsönhatás, a szterikus-, és elektrosztatikus kölcsönhatások sorolhatók (Garrett et al., 2008). A biofilm fejlődésének és kialakulásának kezdeti szakaszában a bakteriális sejtek letapadását kezdetben laza kölcsönhatások biztosítják, amelyekhez esetleg sejt felszíni struktúrák társulnak. Ezt követően, ahogy egyre több sejt vesz részt a biofilm kialakításában, egyre erősebben és specifikusan tapadnak az adott felülethez (Hall-Stoody et al., 2006). Az érési folyamatok megkezdésével kialakul a baktériumsejtek közötti kommunikáció, amely génextpressziós változásokat eredményez. Fontos lépés, hogy ebben a szakaszban a biofilmet alkotó sejtek megkezdik az extracelluláris mátrix szekrécióját, amely rendkívül fontos szerepet tölt be mind az antibiotikumokkal és fertőtlenítőszerrel szemben mutatott védekezés, mind pedig a biofilm fizikális összetartásának fokozása terén (Davies et al., 1998; Vasudevan et al., 2014; Gupta et al., 2016). A folyamatosan növekvő biofilm, többrétegűvé válik, vastagsága 10  $\mu\text{m}$ -t is elérheti (Gupta et al., 2016). Ebben a szakaszban a *P. aeruginosa* által termelt három poliszacharid az alginát, a Pel (glükózban gazdag poliszacharid) és a Psl (pentaszacharid), amelyek nagyon fontos szerepet töltenek be a biofilm stabilizálása során (Colvin et al., 2011; Franklin et al., 2011). A mátrixban a poliszacharidok mellett az extracelluláris DNS is megjelenik, amely szintén stabilizáló szereppel bír. Vizsgálatok támasztják alá, hogy a *P. aeruginosa* kezdeti stádiumban lévő biofilm egységei sokkal érzékenyebben reagálnak a DNáz kezelésre, mint az érett biofilmek (Gloag et al., 2013; Whitchurch et al. 2002). A folyamatos növekedésnek köszönhetően a biofilm vastagsága ennek a fázisnak a végére elérheti a 100  $\mu\text{m}$ -t is. A biofilmet felépítő baktériumok elkezdik összehangolt működésüket, anyagcsere, növekedés valamint a védekezés tekintetében. Így lesz a fejlődésben lévő bakteriális biofilm egyre ellenállóbb a kedvezőtlen környezeti körülményekkel szemben (Davey & O'toole, 2000). Tehát az érés ezen szakasza magába foglalja a sejtek aggregálódását, mikrokolóniák kialakulását, az összetapadt sejtek növekedését, valamint összehangolt működését. Az utolsó szakasz - és egyben a legfontosabb a szervezet krónikus megbetegedéseit tekintve - során diszperzió játszódik le, vagyis a biofilmek leválnak az adott felületről. Ebben a szakaszban a bakteriális biofilm képes arra, hogy a leválást követően másik felületen is megtapadjon. Ebben a fázisban a biofilmet alkotó bakteriális sejtek olyan enzimeket termelnek, amelyek megtörik a poliszacharidok által stabilizált biofilm egységet, így lehetővé válik a letört biofilm darab helyváltoztatása (Hall-Stoody et al., 2006; Otto, 2013).

### 2.2.2. A bakteriális biofilmek felépítése

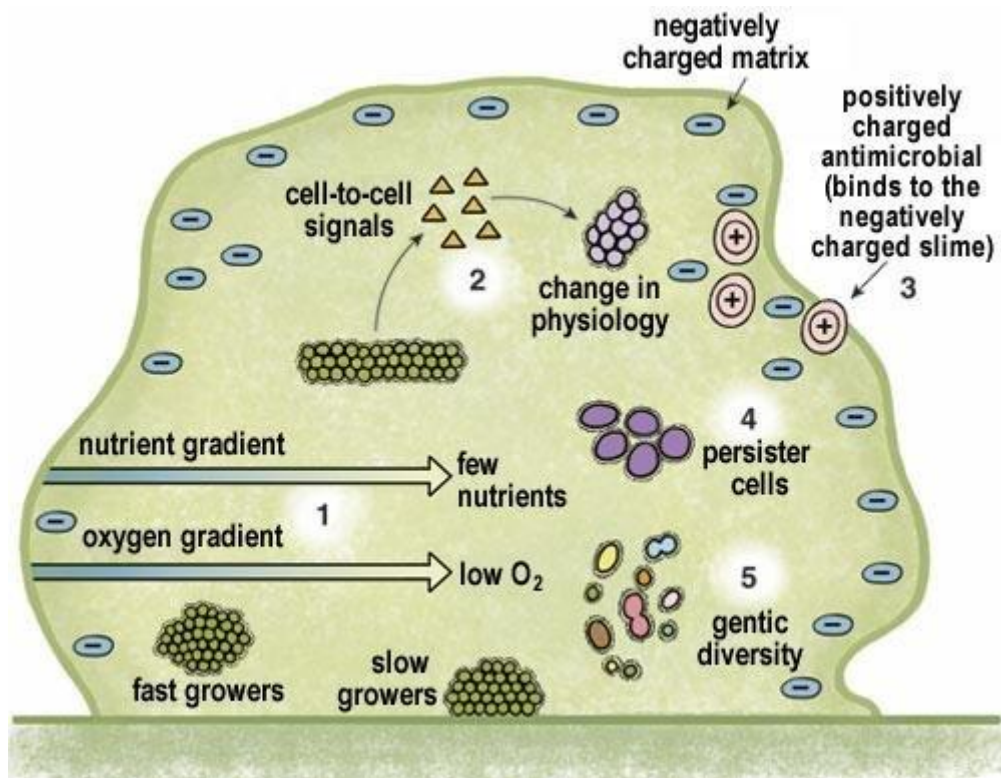
A bakteriális biofilmek specifikus, összetett és bonyolult struktúrák, amelyek minden baktériumtörzs esetén eltérést mutatnak. Azonban vannak olyan kardinális jelentőségű felépítő egységek, amelyek a biofilmformába rendeződött baktériumsejtek ellenállóképességét fokozzák. Ezek az eddig vizsgált baktériumtörzseknel nagyfokú hasonlóságot mutatnak. A strukturális építőkövek működésüket tekintve eltérőek, viszont funkciójukat tekintve azonosak, hiszen a védelmi feladat ellátására irányulnak (Rodis et al., 2020). A legnagyobb problémát a biofilmek fokozott antibiotikum-rezisztenciája és a fertőtlenítőszerrel szembeni ellenállóképessége jelenti (Bressler et al., 2009; Vestby et al., 2009). A legfontosabb felépítő egységek közé a glikokálix, az extracelluláris mátrix (az extracelluláris DNS-el), valamint különböző fehérjék tartoznak (Branda et al., 2005; Hoiby et al., 2010a; Flemming & Wingender et al., 2010).

A biofilmek egyik legalapvetőbb és legfontosabb strukturális jellemzője, hogy a baktériumsejtek meglehetősen közel helyezkednek el egymáshoz. Ez már önmagában elősegíti a túlélést, hiszen a horizontális géntranszfer folyamata gyorsan és könnyen lejátszódhat. A baktériumsejtek plazmidok segítségével képesek rezisztencia gének átadására, fokozódik az antibiotikum-rezisztencia, amely megnehezíti a kezelést (Lewis et al., 2001; Hall et al., 2017). A 0,2-1  $\mu\text{m}$  vastagságú glikokálix minden bakteriális biofilm fontos része, amely glikoproteinekből és poliszacharidokból áll. A van der Waals-erők, valamint a hidrogénhidak teszik lehetővé a glikokálix által a biofilmek erős tapadását az adott felülethez. A glikokálix megakadályozza, hogy antibakteriális szerek bejussanak a biofilmbe, a baktériumsejtek közé, így valósul meg az a folyamat, amely során a baktériumok képesek ellenállni az antibiotikummal illetve fertőtlenítőszerrel való kezelésnek. Mindemellett a glikokálixban felhalmozódó baktérium által termelt enzimek, illetve fehérjék is akadályozhatják az antibiotikum hatását (Sutherland, 2001; Leid et al., 2009; Flemming et al., 2010). A glikokálix egységén belül extracelluláris mátrix figyelhető meg. A mátrix a biofilm első alkotóeleme, amellyel az antibiotikum érintkezésbe lép, amennyiben a glikokálixon átjut. A mátrix egy jelentős barrier, mivel az antibiotikumnak be kell hatolnia egy vastag réteg exopoliszacharid rétegbe, annak érdekében, hogy az a bakteriális DNS és fehérjék területéig be tudjon hatolni. Amennyiben a glikokálix és a mátrix képes a bejutó antibiotikum egy részét „eliminálni”, a bakteriális egység belsejébe mindössze annyi antibiotikum jut be, amennyi arra elegendő, hogy rezisztencia alakulhasson ki az adott szerrel szemben (Fletcher et al., 1992; Taraszkiwicz et al., 2013; Lebeaux et al., 2014). Ez a hipotézis alátámasztást nyert, amikor megállapították,

hogy a szubterápiás  $\beta$ -laktám antibiotikum koncentráció *P. aeruginosa* esetében fokozott mátrix szintézist indukál, amely az antibiotikumokkal szembeni ellenállóképességet növeli. A *P. aeruginosa* extracelluláris polimer anyagaiban a D-glüklóz, D-mannóz és L-ramnóz egységek mellett  $\beta$ -laktamázok halmozódnak fel. (Hoiby et al., 2010b; Rodis et al., 2020). A mátrixot antibiotikum csapdának is szokták nevezni, hiszen egy természetes kémiai gátnak minősül az antibiotikumokkal szemben (Hoiby et al., 2010b; Hall et al., 2017), mivel például a pozitív töltésű aminoglikozid antibiotikumok kötődnek a negatív töltésű extracelluláris mátrixhoz (Hoiby et al., 2010b; Rodis et al., 2020). Ezen kívül a negatív töltésű extracelluláris DNS egy természetes poliamin, a spermidin szintézisét és felhalmozódását eredményezi a sejtfelszínen, amely védelmet nyújt a polimixinek ellen (Myszka et al., 2012). A sejt felületén lévő spermidin megköti a lipopoliszacharidot (LPS), és stabilizálja a külső membránt az oxidatív stressz és az antibiotikum károsító hatásaival szemben (Petropoulos et al., 2004; Johnson et al., 2012). Fontos kiemelni, hogy az extracelluláris DNS is elősegíti a horizontális géntranszferet a biofilmet felépítő baktériumsejtek között, amely lehetővé teszi a rezisztencia gének gyors átadását (Hall et al., 2017). A fenti mechanizmusok és az extracelluláris polimer tulajdonságainak segítségével a *P. aeruginosa* által eredményezett biofilm 1000-szer ellenállóbb a tobramicinnel szemben, a planktonikus formákhoz képest (Rodis et al., 2020). A *K. pneumoniae* esetében megfigyelték, hogy az általa létrehozott biofilm belsejébe ciprofloxacinnel képes behatolni, de hatását már nem képes kifejteni (Taraszkiwicz et al., 2013). Az oxacillin, a cefotaxim és a vankomicin korlátozott mértékben képes a *S. aureus* és a *S. epidermidis* biofilm barrierjein átjutni, amely további rezisztencia kialakulását indukálja (Hall et al., 2017).

A biofilmek a baktériumok által termelt enzimeket is tartalmazza, amely segítségével az antibiotikumok enzimatis inaktiválása valósulhat meg. Ezek az enzimek leggyakrabban a külső területeken halmozódnak fel, annak érdekében, hogy az antibiotikumok inaktiválását követően, azok ne kerülhessenek be a mélyebb rétegekbe, így segítve a baktériumok túlélését. Emellett a különböző enzimek felhalmozódásának és aktivitásának köszönhetően a biofilmbe szerveződött baktériumok képesek ellenállni a nehézfémeknek (higany, ólom, réz, króm, ezüst), megnövekedett ellenállást mutatnak aromás vegyületekkel, fenolokkal valamint különböző oldószerekkel (pl. formaldehid, etanol, kloroform) szemben is (Cloete et al., 2003; Rodis et al., 2020). A biofilmek felépítésére jellemző továbbá a heterogenitás (Socransky et al., 2002). Ez a jelenség abban nyilvánul meg, hogy a biofilm belsejében az anyagcsere és a szaporodás lassul, mivel kevés a tápanyag és az oxigén, míg a felszínen a sejtek élénkebb anyagcserét mutatnak, és jobban szaporodnak (Singh et al., 2017). Ez a jelenség összefügg azzal, hogy a periférián

elhelyezkedő baktériumsejtek nagyobb eséllyel jutnak oxigénhez, amelyet felhasználva aerob módon növekednek. Így az aerob réteg alatt egy anaerob szakasz alakul ki. Ennek következtében figyelhető meg az azonos fajhoz tartozó baktériumsejtek eltérő működése (Stewart & Franklin, 2008; Dufour et al., 2012). A krónikus fertőzések kialakulásában az úgynevezett persister sejtek fontos szerepet játszanak. Ezek azok a sejtek - a biofilmet felépítő baktériumsejtek közül - amelyek a legnagyobb fokú rezisztenciát mutatják az antibiotikumokkal és fertőtlenítőszerrel szemben. Az antibiotikum kezelés befejezése után ezek a sejtek szaporodni kezdenek, és újra építik a biofilmet (Admassie et al., 2018). Fontos kiemelni, hogy a bakteriális biofilmet nemcsak egy baktériumtörzs alkothatja. A krónikus középfülgyulladásban a *S. pneumoniae* és *M. catharralis* által létrehozott kevert biofilm figyelhető meg, amelyben a *S. pneumoniae* adja az ampicillinnel szembeni, a *M. catharralis* pedig a  $\beta$ -laktámokkal szemben rezisztenciát (Hall et al., 2017). A bakteriális biofilmek felépítése és működése közti összefüggések megállapítása, valamint strukturális sajátosságainak felderítése segítséget nyújt az ellenük való védekezés területén. Sok esetben továbbra is nehézségekbe ütközik a biofilmek visszaszorítása, és így a krónikus megbetegedések kezelése. Azonban szerkezetük és az egyes alkotóelemek funkciójának ismerete esetén lehetőségünk nyílik új, célzott hatású alternatív terápiai szerek bevezetésére a biofilmekkel szembeni védekezés érdekében. A biofilmek felépítését a 2. ábra szemlélteti.





2. ábra. A biofilm szerkezetének sematikus ábrázolása. 1: biofilm belsejében lévő baktériumok nagyon lassan szaporodnak, mert alacsonyabb koncentrációjú az oxigén és a tápanyag jelenléte, 2: gyorsan szaporodó sejtek a biofilm külső részén figyelhetők meg, jellemzőjük, hogy érzékenyebbek az antimikrobiális vegyületek hatásaira, 3: A biofilm mátrix negatív töltésű, ezáltal lehetővé válik a kötődés pozitív töltésű vegyületekhez, beleértve az antimikrobiális szereket is, ezzel megakadályozva, hogy eljussanak a biofilmen belüli sejtekhez. 4: A perzisztens sejtek nem szaporodnak antimikrobiális szerek jelenlétében, de nem is pusztulnak el; ha az antimikrobiális szert eltávolítják, képesek újra a szaporodásra. 5: A populáció genetikai és fiziológiai sokfélesége növeli a túlélés esélyét (Harrison et al., 2005).

### **2.2.3. A quorum sensing (QS) mechanizmus**

Az utóbbi években igazolódott, hogy a baktériumok képesek kommunikálni egymással, amely génexpressziós változásokhoz vezet. Ezt nevezzük quorum sensing folyamatnak, amely a baktériumsejtek különféle fiziológiai aktivitását vezérli. A quorum az a minimális sejtsűrűség, amely szükséges az inger-válasz rendszer kialakulásához, a sensing pedig a folyamatot szabályozó jelmolekulák érzékelését jelenti (Fuqua et al., 1994). Mind Gram-negatív, mind Gram-pozitív baktériumok esetén léteznek quorum sensing mechanizmusok, de az általuk továbbított szignál molekulák eltérőek. A baktériumok a kibocsátott szignál molekulák segítségével befolyásolják, módosítják, irányítják a biofilmbe rendeződött baktériumpopuláció működését. Amikor a szignál molekulák koncentrációja eléri egy olyan küszöbértéket, amely a baktériumsejtek sűrűségének megfelel, akkor specifikus génexpresszió indul el. A quorum sensing rendszerek kizárólag akkor működnek, ha megfelelő számú baktériumsejt található adott területen, azaz sűrűségfüggő. A mechanizmus révén lehetővé válik a fertőzések patogenitásának növelése, az antibiotikum-rezisztencia kialakulása, a szervezet gyulladásozó folyamatainak elindítása valamint a biofilm folyamatos növelése (Singh et al., 2017; Rodis et al., 2020). Ennek köszönhetően az antibiotikum-rezisztencia kialakulása felgyorsul (Chioro et al., 2015; Abdula et al., 2016). Az antibiotikumok alkalmazása egyfajta szelekciót indukált, így szinte az összes kórokozó képes rezisztenciát mutatni (Tacconelli et al., 2018; Cassini et al., 2019). A brit kormány megbízásából készült vizsgálatok azt vetítik előre, hogy 2050-re az antimikrobás rezisztencia évente 10 millió halálesetet okozhat (Whiteley et al., 2017; O’Niel et al., 2020). Ezért rendkívül fontos olyan szerek felderítése, és optimalizálása, amely lehetővé

teszi a quorum sensing rendszer blokkolását (Haque et al., 2018; Zhao et al., 2017; Jiang et al., 2019; Zhao et al., 2020). A bakteriális quorum sensing rendszerek működése szabályozza a különféle sejtszintű folyamatokat, patogén génexpressziót, toxintermelést, extracelluláris poliszacharid szintézist egyaránt (Turan et al., 2017; Bauerle et al., 2018; Wei et al., 2018). Gram-negatív baktériumok esetében az acil-homoszerin-lakton molekula indukálja a quorum sensing mechanizmus működését, a Gram-pozitív baktériumoknál oligopeptid szignál molekulák a prekursorok, emellett vannak olyan rendszerek, amelyekben a furán-borát-diészterek kapnak kulcsszerepet. A prekursor molekulák megfelelő sejtsűrűség esetén szekretálódnak, amelyek megjelenése révén a baktériumsejtek számos virulencia faktort kezdenek el szintetizálni, növelve a patogénitást (Monnet et al., 2015). Amikor a szignál molekula koncentrációja elér egy megfelelő szintet - azaz elegendő baktériumsejt vesz részt a folyamatban - akkor a sejtmembránon lévő receptorhoz kötődik, majd a foszforilációs-defoszforilációs kaszkádot követően transzkripciós mechanizmust indukál, amely legtöbb esetben rezisztencia gének expressziójához vezet (Chen et al., 2016; Papenfort et al., 2016). A környezeti alkalmazkodóképesség növelése érdekében kialakult biofilm struktúrák létrehozásában a quorum sensing rendszer fontos feladatot lát el. Ekkor indul el a baktériumok alginát, extracelluláris poliszacharidok, toxikus faktorok termelése, ezáltal a baktériumok biofilm képzése (Zhao et al., 2020).

#### **2.2.4. A bakteriális biofilmek által okozott egészségügyi problémák**

A biofilm fertőzés során a szervezet veleszületett, és szerzett immunválaszai is aktiválódhatnak, de egyik sem képes a biofilmet kialakító kórokozó visszaszorítására, ehelyett az immunválasz felgyorsítja a szövetkárosodást (Moser et al., 2017). Ebből következtethető, hogy a biofilmmel kapcsolatos betegségek lassan alakulnak ki, de általában tartósan fennállnak, az immunrendszer ritkán képes visszaszorítani; emellett a bakteriális biofilmek csekély mértékben reagálnak az antibiotikummal történő kezelésekre (Vestby et al., 2020). A biofilmet képző baktériumok krónikus fertőzéseket okoznak, tartós szövetkárosítással (Hoiby et al., 2010b; Rodis et al., 2020). Becslések szerint a bakteriális fertőzések 65-70%-a társul biofilm képződéssel (Dibartola et al., 2017; Rodis et al., 2020). A bakteriális biofilmek tulajdonképpen a szervezet minden szervrendszerében megtalálható, és nehezen kezelhető kórképeket eredményeznek (2. táblázat).

2. táblázat A bakteriális biofilmek által okozott problémák a különböző szervrendszerekben

Szervrendszer	Biofilm által okozott probléma	Kórokozó	Hivatkozás
szív-és érrendszer	infektív endocarditis	<i>Streptococcusok</i> és / vagy <i>Enterococcusok</i>	Elgharably et al., 2016
emésztőrendszer	sialolithiasis (nyálkövesség)	nyálmirigyek sérülése - fokozott kalcium kiválasztódás-lerakódás	Kao et al., 2019; Fusconi et al., 2016; Perez-Tanoira et al., 2019
	hepatitis, epehólyag gyulladás, kolangitis, hasnyálmirigy gyulladás, hepatobiliaris carcinoma	<i>S. enterica</i> Thypi	Crum et al., 2003; Vaishnavi et al., 2005
	gyulladásos bélbetegség (Crohn betegség)	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Escherichia coli</i>	Swidsinski et al., 2005; Swidsinski et al., 2009; Martin et al., 2004
integumentáris rendszer (bőrfelület)	krónikus sebek	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp., valamint a <i>Clostridium</i> spp	Percival et al., 2012; James et al., 2008 Costerton et al., 1999; Bjarnsholt et al., 2013; Parsek et al., 2003; Davis et al., 2008
reproduktív rendszer	bakteriális vaginózis	<i>Gardnerella vaginalis</i> , és <i>Atopobium vaginae</i>	Jung et al., 2017; Machado et al., 2015
	krónikus endometritis (méhnyálkahártya gyulladás)	<i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>G. vaginalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>P.aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. és <i>Streptococcus</i> . spp.	Moreno et al., 2017; Mitchell et al., 2015; Moreno et al., 2016; Cicinelli et al., 2009
kiválasztó szervrendszer	krónikus bakteriális prosztatagyulladás	<i>E. coli</i> , a <i>Proteus mirabilis</i> , a <i>P. aeruginosa</i> , a <i>Klebsiella</i> spp., egyéb <i>Enterobacteriaceae</i> , valamint az <i>E. faecalis</i>	Yoon et al., 2012; Wagenlehner et al., 2008; Weidner et al., 1991
	bakteriális húgyuti fertőzések		Anderson et al., 2003; Berry et al., 2009; Liu et al., 2016; Olson et al., 2016

A továbbiakban a légúti traktusban előforduló biofilmeket ismertetjük részletesebben.

A légutakban megfigyelhető baktériumok által eredményezett biofilmek visszaszorítása jelentős problémát okoz. Mivel a légutak közvetlen kapcsolatban állnak a környezettel, így a mikrobák könnyen bejuthatnak ezekre a területekre. A légúti fertőzések különböző formái a klinikai gyakorlatban előforduló leggyakoribb infekciók közé tartoznak (Deák, 2013). A középfülgyulladás (otitis media) az óvodás korú gyermekek fertőzésének egyik leggyakoribb oka (Auinger et al., 2003; De Antonio et al., 2016). A kórkép lehet akut hurutos, krónikus és savós (Schilder et al., 2016), amelyek mindegyike átmeneti vagy tartós halláskárosodáshoz vezethet (Monasta et al., 2012). A nasopharynx otopatogén baktériumok, például a *S. pneumoniae* és a nem tipizálható *H. influenzae* (NT-Hi) kolonizációja kora gyermekkorban jelentősen növeli a középfülgyulladás kockázatát az élet későbbi szakaszaiban (Faden et al., 1997; Chonmaitree et al., 2016). Pásztázó elektronmikroszkóppal és konfokális lézeres pásztázó mikroszkóppal végzett későbbi kutatások megerősítették, hogy biofilmeket találtak mind a humán, mind az állatmodellek középfülében. Ma a biofilmeket a középfülgyulladás patogenezis részének tekintik (Fergie et al., 2004; Ehrlich et al., 2002; Hall-Stoodley et al., 2006; Post et al., 2001). A savós középfülgyulladásban szenvedő gyermekeknél *in vivo* biofilmeket jelző baktérium-aggregátumokat detektáltak a szövetek kóros telítődésének vizsgálata során, amely megerősítette, hogy biofilmek kialakulhatnak nemcsak a középfül nyálkahártyáján, hanem a középfül folyadékban is (Daniel et al., 2012; Van Hoecke et al., 2016). Az akut, hurutos középfülgyulladás leggyakrabban az öt év alatti gyermekeknél fordul elő (Schilder et al., 2016). Alátámasztották, hogy az orrgaratból származó baktériumok leválhatnak, majd a középfülbe juthatnak, és akut fertőzést okozhatnak (Coticchia et al., 2013; Kaur et al., 2011). A középfül krónikus gyulladása során a dobhártya területe is érintett, így kijelenthető, hogy ez a legveszélyesebb formája a középfülgyulladásoknak (Verhoeff et al., 2006; Mittal et al., 2015; Vestby et al., 2020). A krónikus középfülgyulladás esetén a bakteriális biofilmeket a nyálkahártya 92%-án detektálták (Coticchia et al., 2013; Gu et al., 2014). Így nem meglepő, hogy a bakteriális biofilm a megfelelő antibiotikum terápia ellenére is eredményezheti a betegségbe való visszaesést. Ennek legfőbb oka, hogy az orálisan beadott antibiotikumok nem érik el a középfülben azt a koncentrációt, amely a biofilmek felszámolásához szükséges (Belfield et al., 2015).

A rhinosinusitis az orr és az orrmelléküregek gyulladása, amelyet orrdugulás, a légutak elzáródása, vagy orrfolyás jellemez. További tünetek lehetnek a szagvesztés, az arcfájdalom és a nyomásérzet kialakulása. A betegség időtartama szerint megkülönböztetünk akut rhinosinusitist, ha 12 hétnél rövidebb ideig tart, vagy krónikus rhinosinusitist, ha 12 hétnél

tovább tart (Fokkens et al., 2012). Bizonyos vírusok (például: rhinovírus, respiratoris syncytialis vírus, influenza vírus, koronavírus, parainfluenza vírus, adenovírus, enterovírus) az akut rhinosinusitis akár 80-90% -át teszik ki. A vírusfertőzéssel szemben a gazdaszervezet immunválasza a legtöbb esetben hatásosnak bizonyul, amely végül megszünteti a behatoló ágenszt. Azonban elhalt hám- és immunsejteket is generálnak, ami alkalmas környezetet teremt a másodlagos bakteriális fertőzésekhez (Tan et al., 2017; Wu et al., 2019). A legtöbb esetben *S. aureus* és *S. pneumoniae* áll a háttérben (Marks et al., 2013; Maina et al., 2018). A biofilm jelenlétét állatmodellekből, és humán betegekből izolált minták támasztják alá (Foreman et al., 2012; Harvey et al., 2007; Ramakrishnan et al., 2015). Az elhúzódó kórkép hátterében az áll, hogy a biofilmek a mucociliáris területeken károsítják a hámréteget, továbbá a biofilmek megjelenésének következtében a csillók funkcióikat elveszítik, valamint helyi gyulladást indukálnak (Wood et al., 2011).

A pharyngitis vagy a torokfájás nagyon gyakori betegség. Az esetek többsége vírusos, de 10-25% -át baktériumok okozzák (Zautner et al., 2012). A leggyakrabban előforduló baktériumok közé a *S. aureus*, a *Haemophilus* nemzetség tagjai, valamint *Streptococcus* nemzetség képviselői tartoznak. A mandulák felületén megjelentő bakteriális biofilmeket *in situ* azonosították pásztázó elektronmikroszkóp, konfokális mikroszkóp, valamint fény- és transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével (Roberts et al., 2012; Woo et al., 2012).

A krónikus gégegyulladás szintén a légutakat támadó jellemző megbetegedés. Konfokális pásztázó lézeres mikroszkóppal és biopszia segítségével rendelkezésre álló minták vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a krónikus gégegyulladásban szenvedő betegek 62% -ában detektáltak bakteriális biofilmet, míg a kontroll esetében ez az érték mindössze 20% -ra tehető. Ezzel sikerült alátámasztani azt a hipotézist, hogy a krónikus gégegyulladás tüneteinek súlyosbításához is biofilmek járulnak hozzá (Kinnari et al., 2015).

A pertussis, más néven a szamárköhögés egy rendkívül fertőző betegség, amely ellen két, három és négy hónapos korban kapják meg a gyermekek a védőoltást. Azonban az oltást 10 évente ajánlott ismételni, de mivel a lakosság nagy része ezt figyelmen kívül hagyja, így kis számban előfordulnak pertussisban szenvedő páciensek (Melvin et al., 2014). A pertussist leggyakrabban a *Bordetella pertussis* okozza, amelynek a csillós hámmal tapadó biofilm képződményeit először egérmodellből izolálták (Cattelan et al., 2016).

A cisztás fibrózis volt az első olyan fertőzés, ahol sikerült a biofilm struktúráját azonosítani, amelyet *P. aruginosa* okozott (Hoiby et al., 2010a). A cisztás fibrózis egy genetikai betegség, amely elsősorban a légzőszerveket és az emésztőrendszert érinti, és viszkózus nyák termelésével és krónikus fertőzésekkel jellemezhető. A tüdőfertőzés a morbiditás és a halálozás

fő oka (Ciofu et al., 2015). Fiatal betegeknél elsősorban a *S. aureus* és a *H. influenzae* kolonizálódik a légutakban, a *P. aeruginosa* a későbbi szakaszokban dominál (Hector et al., 2016). A cisztás fibrózisban szenvedő gyermekek tüdőmintáiban biofilmszerű struktúrákba rendeződött *H. influenzae* egységeket figyeltek meg (Starner et al., 2006) emellett *P. aeruginosa* biofilmet detektáltak tüdőszövetben, tüdőtályogban és köpetben egyaránt (Baltimore et al., 1989; Hoiby et al., 2001; Lam et al., 1980; Singh et al., 2000). Mikroszkópos elemzések kimutatták, hogy a köpetben lévő *P. aeruginosa* a köpet alkotórészeihez tapadó mikrokóniákként nő (Worlitzsch et al., 2002). A biofilm jelenlétére reagálva nagyszámú neutrofil granulocita figyelhető meg az adott szöveti struktúrában, amely krónikus gyulladást okozva, szövetkárosodást, a tüdő működésének elvesztését és a légutak elzáródását, funkcióvesztését indukálja (Worlitzsch et al., 2002; Yoon et al., 2002). A fent említett kórképek igazolják, hogy a bakteriális biofilmek a szervezet minden pontján problémát eredményeznek, hiszen nagymértékben befolyásolják a kezelés hatékonyságát (Solano et al., 2014). A biofilmképződés növeli a baktériumok ellenállását a szervezet védekező mechanizmusai ellen, valamint akadályozza a betegségek visszaszorítását az antibiotikus kezelés hatására, ezzel elősegítve a krónikus fertőzések térhódítását. A fehérvérsejtek, amelyek az immunválasz fontos tényezői, nem képesek bejutni a biofilm struktúrájába, így a gazdaszervezet immunválasza képtelen fellépni a biofilmekkel szemben, és csökkent fagocita kapacitás figyelhető meg (Leid et al., 2009). Ezen kívül a biofilmek a puszta jelenlétükkel többféle módon is módosíthatja a helyi immunválaszt, például a helyi gyulladásos válasz stimulálásával, amely szövetkárosodást eredményez. Ennek értelmében elengedhetetlen a bakteriális biofilmek, valamint az ellenük való védekezés lehetőségeinek alapos megismerése, alternatív módok kutatása.

### 2.3. Az illóolajok általános jellemzése

Az illóolajok növényi részekből előállított, többkomponensű, jellegzetes illatú és ízű, szobahőmérsékleten maradék nélkül elpárolgó folyadékok (Horváth, 2010). Az illóolajok a növények anyagcseretermékei, amelyek a legkülönbözőbb növényi részekben halmozódhatnak fel: virág, rügy, levél, szár, mag, gyökér vagy akár a kéreg szekréciós sejtjeiben (Bakkali et al., 2008; Horváth, 2010). További jellemzőjük, hogy levegőn könnyen elpárolognak, aromás, hidrofób folyadékok, amelyeket legtöbbször vízgőz-desztillációval állítanak elő (Kon & Rai 2013). A sajtolás (préseléses eljárás, citrusok esetében elterjedt), az enflourage (pomádés eljárás) és a szerves oldószeres kivonás mellett a szuperkritikus extrakció (SCFE), valamint az ultrahang és mikrohullámmal kombinált extrakciós technikák is alkalmasak lehetnek illóolajok kivonására (Bakkali et al., 2008; Horváth, 2010; Ma et al., 2015). A gyógy- és fűszernövények 0,5-2,5%-ban tartalmazhatnak illóolajokat, amelyeknek jellegzetes illatukat, aromájukat, valamint részben gyógyhatásukat köszönhetik. Régóta ismert, hogy bizonyos illóolajok baktérium-, gomba-, vírus- és parazitaellenes hatással is rendelkeznek (Pattnaik et al., 1997; Kalemba & Kuniczka, 2003; Syafiq et al., 2020). Jelenleg mintegy 3000 illóolaj ismert. Az illóolajokat nemcsak a gyógyszeripar, hanem a kozmetikai ipar és az élelmiszeripar is alkalmazza. Az illóolajokat, vagy egyes komponenseit felhasználják parfümökben, sminktermékekben (Sarkic et al., 2018), egészségügyi termékekben, fogászatban, mezőgazdaságban, élelmiszer tartósítószerként (Pateiro et al., 2018), adalékanyagként, és az aromaterápiában (Hajhashemi et al., 2003; Perry et al., 2003; Silva et al., 2003). Az illóolajok összetételét befolyásolja a kivonás módja, az éghajlat, a talaj paraméterei, a növényi rész, és a növény-fenofázis állapota (Masotti et al., 2003; Angioni et al., 2006). Az illóolajok kémiailag komplexnek mondható kivonatok, hiszen fő- és mellék-komponensekből állnak; némely összetevő pedig csupán nyomokban fordul elő bennük (Bakkali et al. 2008; Horváth, 2010). Az illóolajok komponensei lipofil sajátságúak, ennek köszönhetően szerves oldószerekben oldódnak (Rácz 2012). Az illóolajok összetevői főként különböző terpének (pl. monoterpének szeszkviterpének, diterpének) illetve fenilpropán-származékok (pl. eugenol, izoeugenol, fahéjaldehid) (Burt, 2004; Horváth, 2010; Hyldgaard et al. 2012; Tisserand & Young, 2014).

Az alábbiakban a vizsgálatokba bevont illóolajok rövid jellemzését ismertetjük. Az alábbi illóolajokat egyrészt gyakori használatuk miatt, másrészt a PTE GYTK Farmakognóziái Intézet Illóolaj Kutatócsoportjának előzetes vizsgálati eredményei alapján választottuk ki (Ács, 2018).

### 2.3.1. A borsmenta illóolaj

A borsmenta illóolaj *Menthae piperitae aetheroleum* néven hivatalos a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben (Ph. Hg. VIII. 2010). Az Európa területén őshonos borsmenta (*Mentha x piperita* L.) a Lamiaceae család képviselője, évelő, négyszögletes szárral rendelkező 30-90 cm méretű gyógynövény. Levelei zöld színűek, fűrészszélűek, hosszúkas alakúak. Virágai aprók, lilás színt mutatnak (Singh et al., 2015). Széles körben elterjedt Észak- és Kelet-Európában, az Amerikai Egyesült Államokban és Afrikában egyaránt. Természetes élőhelyein folyamatosan termesztik, hiszen az egész világon fontos gyógynövényként ismert (Mahendran & Rahman, 2020). Hatóanyagai (pl. illóolaj, flavonoidok, polifenolok, karotinoidek) miatt alkalmazzák láz- és fájdalomcsillapítóként, görcsoldóként és izzasztó hatása miatt (McKay & Blumberg, 2006). Illóolaja a vegetatív szervek növekedésének kezdetétől fogva legnagyobb mennyiségben a levél trichómáiban figyelhető meg. A borsmentaolajat a növény herbájából vonják ki. Halványzöld (Csupor & Szendrei, 2012) vagy sárga színű jellegzetes ízű és illatú illóolaja nagyszámú terpenoid vegyületet tartalmaz. Illóolajának friss, mentolos illatáért a két, legnagyobb mennyiségben előforduló főkomponense felelős, a mentol (35-60%) és a menton (2-44%). További összetevők közé tartozik a mentil-acetát (0,7-23%), az 1,8-cineol, vagy más néven eukaliptol (1-13%), a mentofurán (0,3-14%), az izomenton (2-5%), a neomentol (3-4%), a limonén (0,1-6%), és a fő szeszkviterpén komponens, a  $\beta$ -kariofillén (1,6-1,8%) (Rohloff, 1999; Tisserand & Young, 2014; Riachi & De Maria, 2015; Brahmi et al., 2017; Mahendran & Rahman, 2020). Illóolajának friss illata, valamint hűsítő utóérzete miatt közkedvelt felső légúti megbetegedések esetén elsősorban orrdugulás tünetének enyhítésére, a légzés hatékonyságának növelésére. Emellett élénkítőként, köptetőként, gyulladáscsökkentőként, és puffadás ellen is alkalmazzák (Cowan, 1999). Mindemellett antibakteriális (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. enteritides*, *E. coli*, *Xantomonas campestris*) hatásáról számoltak be tanulmányok (Bassolé, 2010; Vivek et al., 2010; Jeyakumar et al., 2011; Afridi et al., 2016; Satmi & Hossain, 2016), továbbá antifungális (*Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Candida sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*) hatásáról is ismert (Sandasi et al., 2011; Tyagi & Malik, 2011; Zaidi & Dahiva, 2015; Desam et al., 2017; Nilo et al., 2017). Tanulmányok irányultak arra, hogy a borsmenta illóolajának vírus ellenes hatását alátámasszák. Minami és munkatársai bebizonyították, hogy a borsmenta illóolaja képes a *Herpes simplex* vírus szaporodását gátolni (Minami et al., 2003). Az illóolaj gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító (Sun et al., 2014; Mogosan et al., 2017), antioxidáns (Singh et al., 2015;



Khalil et al., 2015; Bellasoued et al., 2018) valamint antidiabetikus (Yen et al., 2015; Abdellatif et al., 2017) hatását *in vivo* állatkísérletek igazolják (Mahendran & Rahman, 2020).

### 2.3.2. A fahéjkéreg illóolaj

A fahéjkéreg illóolaja megtalálható a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben *Cinnamomi zeylanici corticis aetheroleum* néven (Csupor & Szendrei 2012). Az anyanövény a babérfélék családjába (Lauraceae) tartozó fahéjfa (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.) kérge eleinte fűszerként, tartósítószerként (Pittman, 2011) és aromaanyagként (Yu et al., 2014; Ranasinghe et al., 2017) történő alkalmazásának köszönhetően vált népszerűvé (Kumar & Kumari, 2019). Később a leveléből, valamint a kéregből desztillált illóolaja miatt terjedt el széles körben (Rawat et al., 2019). Srí Lankán és India keleti részein honos (Singh et al. 2007; Bakkali et al. 2008; Evans 2009). A legfontosabb fahéjfa termesztő területek közé Sri Lanka (Bhau et al., 2015) mellett a Seychelles-szigetek, Madagaszkár, India (De Guzman et al., 1999) továbbá Brazília és Jamaika tartozik (Goyal et al., 2018; Rawat et al., 2019). A növény jellemzője, hogy a január hónapban virágba boruló fák magassága elérheti a 10-15 métert (Jayaprakasha & Rao 2011). A 7-18 cm hosszú, vastag, bőrszerű sötétzöld leveleit viaszréteg borítja (Ravindran et al., 2003; Chakraborty et al., 2015). Virágai zöldes, vagy sárgásfehér színűek, termése bogyótermés, amely egyetlen magot tartalmaz. Kérge vastag, vörösesbarnás színt mutat. A kéreg lehántásának optimális időpontja, amikor a növény levelei teljesen zöld színűek (Balasubramanian et al., 2012). Manapság nemcsak fűszerként közismert, hanem gyógyászati jelentősége miatt is felfigyeltek rá. A fahéjat az egyik legjelentősebb antidiabetikus szerként tartják számon (Costello et al., 2016), amelyet klinikai vizsgálatok bizonyítanak (Dugoua et al., 2012; Azimi et al., 2014; Zare et al., 2019). Alkalmas továbbá emésztőrendszeri panaszok enyhítése (Shen et al., 2002). Vérzéscsillapító, fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő (Qabaha et al., 2017; Schink et al., 2018;), valamint szövetregeneráló és sebgyógyító (Ahmadi et al., 2019) hatásai miatt népszerű. A kéregből kinyert illóolaja alkalmazható fungicid, antibakteriális, antivirális és antikarcinogén (Kwon et al., 2010; Zaidi et al., 2015) hatásai miatt. A kéregből desztillált illóolaj sárgás vagy barnás színű, jellegzetes illatú. Fő komponense a fahéjaldehid (65-80%), emellett nagyobb mennyiségben eugenolt,  $\alpha$ - és  $\beta$ -kariofillént, linaloolt és  $\alpha$ -pinént tartalmaz (Jayaprakasha & Rao 2011, Tisserand & Young 2014). A fahéjkéreg illóolaja az egyik leginkább kutatott, természetes eredetű antibakteriális szer (Vasconcelos et al., 2018; Singh et al., 2021). Erős hidrofób tulajdonsága miatt képes a bakteriális biofilmek

kialakulásának megakadályozására, emellett akadályozza a baktériumsejtek kolonizációját (Kothiwale et al., 2014), valamint emeli a sejtmembrán permeabilitását, így a baktériumsejt tartalmának felszabadulása következtében sejthalált idéz elő. Az illóolaj fahéjaldehid komponense miatt oxidatív stresszt és membránzavarokat is képes kiváltani (Yang et al., 2019). Antibakteriális hatása bizonyított *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. pyogenes*, (Naveed et al., 2013; Sfeir et al., 2013; Ahmadi et al., 2019), *K. pneumonia*, *E. aerogenes* (Rakshit & Ramalingam, 2011; Lakshmeesha et al., 2014), *E. coli*, *Salmonella sp.* (Naveed et al., 2013), és húgyuti fertőzéseket eredményező (Shreya et al., 2015) baktériumokkal szemben. *Mycobacterium tuberculosis* (Mota et al., 2019), *Serratia marcescens* (Aparna et al., 2014), *S. mutans*, *S. sobrinus* (Choi et al., 2016) baktériumokkal szemben is hatásosnak bizonyult. Antifungális hatása sem elhanyagolható: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* (Freire et al., 2011), *Candida sp.*, *A. niger* (Essid et al., 2017; Ainane et al., 2019) gombákkal szemben egyaránt hatásosnak bizonyult a fahéjkéreg illóolaj alkalmazása (Singh et al., 2021). A fahéjkéreg illóolaja antimikrobás hatása mellett, fenolos komponenseinek köszönhetően kiemelkedő antioxidáns kapacitással is bír (Mazimba et al., 2015). Tumorelles hatását Bhagavathy & Latha (2015), Ezzat és munkatársai (2017) valamint He és kutatócsoportja (2019) írták le. Kellemes illatának köszönhetően leginkább inhalálóként közkedvelt (Jayaprakasha & Rao 2011).

### **2.3.3. A kakukkfű illóolaj**

A kakukkfű illóolaja hivatalos a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben *Thymi aetheroleum* néven (Csupor & Szendrei 2012).

A kakukkfű (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) számos, gyógyászati szempontból jelentős hatással rendelkezik. Mediterrán területeken őshonos, fásodó szárú félcserje. Levelei ovális alakúak, virágai apró fehér vagy halvány rózsaszínűek, júniustól júliusig virágzik (Hossain et al., 2013). A kakukkfű levelét gyógyteákban alkalmazzák, megfázás tüneteinek enyhítése céljából. Emellett kivonatát fertőtlenítő hatása miatt, szájvizekben használják, sebgyógyítást elősegítő, antibakteriális (Fachini-Queiroz et al., 2012; Sharifi-Rad et al., 2017), gyulladáscsökkentő (Kamdem et al., 2015) és antidiabetikus hatása is ismert (Taleb et al., 2017). A növény illóolaj-tartalma mellett, szaponinokat, tanninokat, valamint flavonoidokat is tartalmaz (Fayad et al., 2013; Hossain et al., 2013; Nemati et al., 2018; Gedikoğlu et al., 2019), így antioxidáns hatása is jelentős (Manconi et al., 2018; Taghouti et al., 2018). A kakukkfű illóolaja a hazánkban is termesztett kerti kakukkfű virágzó hajtásaiból állítható elő. A növény

lágyszárú részei 1-2,5%-ban tartalmazzák az erőteljes, jellegzetes illatú, általában színtelen vagy halványsárgás illóolajat. A kakukkfű illóolajának főkomponense a timol (10-64%) és a karvakrol (5,5-16,3%) (Tisserand & Young, 2014). Ezen kívül kisebb mennyiségben tartalmaz terpinén-4-ol, kámfor és  $\beta$ -mircén komponenseket is (Hazzit et al., 2009). A kakukkfű illóolajával kapcsolatos kutatások alátámasztották, hogy terápiás szempontból alkalmas mind idegrendszeri és légzőszervi, mind pedig kardiovaszkuláris betegségek kezelésére (Rizwana et al., 2020). Mindemellett fontos kiemelni köptető, antioxidáns, tumorelles, antimikrobás, gyulladáscsökkentő, görcsoldó és májvédő hatásait is (Amiri et al., 2012; Fachini-Queiroz et al., 2012). Az élelmiszeripar tartósítás (Zhang et al., 2014) céljából alkalmazza (Rizwan et al., 2020). A kakukkfű illóolaja antimikrobás hatással rendelkezik; hatékonyan bizonyult *S. aureus*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* valamint *C. albicans* fajok ellen (Dorman & Deans, 2000; Nascimento et al., 2000; Sartoratto et al., 2004). Magyarországon 8-féle kemotípusát különböztették meg az illóolajnak, amelyek felében a timol és a germakrén-D volt a főkomponens (Baráthné Simkó, 2014). Kísérleteinkben a timolos kemotípust használtuk.

#### 2.3.4. A szegfűszeg illóolaj

A szegfűszeg illóolaja a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos drokként szerepel *Caryophylli floris aetheroleum* néven (Csupor & Szendrei 2012).

Az Indonéziában honos, örökzöld szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry) a mirtuszfélék (Myrtaceae) családjába tartozik. Közismert fűszer, az akár száz évet is élő szegfűszegfát többek között Indonézia, Madagaszkár, Zanzibár területein termesztik (Board et al., 2010; Byng et al., 2016). A közepes méretű, egyenes törzsű fa 10-12 méter magasra is nőhet, levelei elliptikusak. Hét év elteltét követően figyelhető meg a fa első virágzása. Virágai aprók, bíbor színűek (Ortes-Rojas et al., 2014). A szegfűszeg nagy mennyiségben tartalmaz illóolajat, emellett flavonoid, tannin, cserzőanyag és fenolos hatóanyagok jelenléte sem elhanyagolható (Jimoh et al., 2017). A szegfűszegfa illóolaja kinyerhető a szárból, a levélből és a bimbóból is. A virágbimbóból előállított illóolaja sárga színű, főkomponense az eugenol, amelyet akár 70-90%-ban is tartalmazhat (Alma et al., 2004; Khan et al., 2009; Kasai et al., 2016). Emellett kisebb mennyiségben tartalmaz  $\beta$ -kariofillént és eugenil-acetátot (Lee et al., 2009; Csupor & Szendrei 2012; Xu et al., 2016; Mohamed et al., 2018). A szegfűszeg fűszerként elterjedt alkalmazása igen népszerű, emellett a likőrpar és kozmetikai ipar is felhasználja. A szegfűszeg illóolajának antibakteriális, gyulladáscsökkentő (Bachiega et al., 2012; Al-Ameedi et al., 2017;

Han & Parker et al., 2017), fájdalomcsillapító és érzéstelenítő (Fujimoto et al., 2017; Kheawfu et al., 2017; Kaur & Kaushal, 2019) hatásai ismertek. Egyre gyakoribb gyógyászati szempontból történő alkalmazása, hiszen számos kutatás támasztja alá pozitív hatását. Igazolt antimikrobás hatással bír *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus flavus* mikrobákkal szemben (Matan et al., 2012; Mishra & Sharma, 2014). Hatásosnak bizonyult *S. aureus*, *Carnobacterium divergens*, továbbá *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Serratia liquefaciens*, *Shewanella putrefaciens*, *P. aeruginosa*, *S. chloeraesius*, *Yersinia enterocolitica*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *Erwinia sp.*, *S. epidermidis*, valamint *Proteus vulgaris* és *K. pneumoniae* mikroorganizmusokkal szemben (Duraipandiyan et al., 2006; Chaieb et al., 2007; Fu et al., 2007; Gupta et al., 2013; Zengin & Baysal, 2014). Az illóolaj képes a gomba illetve a baktériumfehérjéket denaturálni, valamint membrán permeabilitási elváltozásokat eredményezni (Kaur & Kaushal, 2019). A szegfűszeg illóolajának nemcsak antibakteriális és antifungális aktivitása jelentős. Fenolos komponenseinek (eugenol, eugenol-acetát, timol) köszönhetően antioxidáns kapacitással is bír (Yadav & Bhatnagar 2007; Gulcin et al., 2012; Dai et al. 2013; Najm & Kim, 2013). Leginkább száj- és torokfertőtlenítésre alkalmas, valamint fogfájás enyhítésére is javasolják (Jagadeesh et al. 2011).

### **2.3.5 Illóolajok antibakteriális hatása**

Az illóolajok - természetes eredetüknek köszönhetően - egyre elterjedtebbé és közzismertebbé váltak élelmiszeripari termékek tartósításában, különböző megbetegedések megelőzésében, fertőtlenítő tulajdonságaik miatt, továbbá kardiovaszkuláris, gasztrointesztinális megbetegedések tüneteinek enyhítésében. Az illóolajok hatásainak egyre szélesebb körű ismeretei rávilágítottak ezen természetes anyagok antimikrobás tulajdonságaira (Schuenzel et al., 2002; Bakkali et al., 2008; Guleria et al., 2012; Pandey et al., 2012). Az aromás- és gyógynövényekből nyert illóolajok hatása nagymértékben összefügg azok kémiai összetételével (Bakkali et al., 2008). *In vitro* vizsgálatok támasztják alá, hogy a főkomponens(ek) mellett a minor komponensek is jelentős befolyásoló hatással bírnak (Calo et al., 2015). Az illóolajok legszélesebb körben kutatott biológiai aktivitásai az antioxidáns kapacitás valamint az antibakteriális hatás (Mimica-Dukic et al., 2016; Khorshidian et al., 2018; Mutlu-Ingok et al., 2019). Az illóolajok antibakteriális hatásuk során kifejthetnek bakteriosztatikus - gátolhatják a baktériumsejtek növekedését - vagy baktericid - a baktériumsejtek elpusztítása - hatásokat (Tariq et al., 2019). Eddigi vizsgálatok szerint az illóolajok összetevői közül a fenilpropán-származékok és a fenolos komponensek (pl. timol, karvakrol) jelentős antibakteriális hatással rendelkeznek (Sokovic et al., 2007; Xu et al., 2008;

Sokovic et al., 2009; Kazemi et al., 2012). Hatásmechanizmusukat tekintve legfontosabb támadáspontjuk, hogy képesek a bakteriális sejtmembrán átjárhatóságát, azaz permeabilitását befolyásolni, így beleszólnak az iontranszportba ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ), valamint fehérjedenaturációs folyamatokat is indukálhatnak (Fischer et al., 2009; Guinoiseau et al., 2010; Khorshidian et al., 2018), amelynek következtében az enzimikus folyamatokat gátolják (Chang et al., 2001). A sejtmembrán permeabilitás változásának, az iontranszport felborulásának, a mitokondriális folyamatok gátlásának, és az intracelluláris - extracelluláris ATP egyensúly felborulásának következtében sejthalál áll be (Gill et al., 2004; Mutlu-Ingok et al., 2020). Az illóolajok alternatív/kiegészítő/intergratív terápiás lehetőségeket hordoznak magukban, így népszerűségük folyamatosan emelkedik. Ám ahhoz, hogy kellő hatékonysággal és biztonsággal alkalmazhassuk őket, elengedhetetlen alaposabb megismerésük. Az elmúlt öt év kutatásait az 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat Illóolajok antibakteriális hatása (Mutlu-Ingok et al., 2020)

<b>Illóolaj</b>	<b>Baktérium</b>	<b>Referencia</b>
<i>Elettaria cardamomum</i>	<i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i>	Mutlu-Ingok et al., 2019
<i>Eugenia caryophyllus</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>S. aureus</i>	Lalami et al., 2019
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Mousii et al., 2020
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	Imane et al., 2020
<i>Mentha</i> sp.	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> ,	Tu et al., 2018; Gishen et al., 2020; Bouyahya et al., 2017
<i>Origanum vulgare</i>	<i>S. typhimurium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. jejuni</i>	Pesavento et al., 2015; Boskovic et al., 2015
<i>Pimpinella anisum</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i>	Tu et al., 2018
<i>Pimpinella saxifraga</i>	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. luteus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i>	Ksouda et al., 2019
<i>Piper nigrum</i>	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i>	Purkait et al., 2020
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	Imane et al., 2020; Bouyahya et al., 2017

<i>Salvia officinalis</i>	<i>L. monocytogenes, S. aureus, S. enteritidis, C. jejuni</i>	Pesavento et al., 2015
<i>Salvia sclarea</i>	<i>E. coli, E. faecalis, K. pneumoniae, S. aureus</i>	Imane et al., 2020
<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>B. subtilis, E. coli, S. aureus, S. typhimurium, L. monocytogenes, P. aeruginosa, P. mirabilis, E. faecalis, K. pneumoniae, B. cereus, P. aeruginosa</i>	Imane et al., 2020; Tu et al., 2018; Purkait et al., 2020; Radünz et al., 2019
<i>Thymus sp.</i>	<i>B. cereus, E. coli, L. monocytogenes, S. aureus, P. aeruginosa, S. typhimurium, S. enteritidis, C. jejuni, L. monocytogenes,</i>	Boskovic et al., 2015; Pesavento et al., 2015; Golkar et al., 2020; Ali et al., 2015
<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	<i>B. subtilis, E. coli, S. aureus, S. typhimurium</i>	Tu et al., 2018
<i>Zataria multiflora</i>	<i>B. cereus, E. coli, S. aureus, S. typhimurium</i>	Golkar et al., 2020
<i>Zingiber officinale</i>	<i>E. coli, E. faecalis, K. pneumoniae, S. aureus</i>	Imane et al., 2020

A különböző illóolajok antibakteriális hatása más és más. Bouyahya és munkatársai (2017) *Mentha pulegium* és *Rosmarinus officinalis* illóolajok antibakteriális hatását tesztelte. Összehasonlítva a két illóolaj aktivitását megállapítható, hogy a menta illóolaj hatékonyabbnak bizonyult *S. aureus, P. aeruginosa, L. monocytogenes, B. subtilis, E. coli* és *P. mirabilis* esetén (MIC értékek: *M. pulegium* esetén: *S. aureus*: 2 mg/ml, *P. aeruginosa*: >2 mg/ml, *L. monocytogenes*: 0,5 mg/ml, *B. subtilis*: 1 mg/ml *E. coli*: 2 mg/ml *P. mirabilis*: 1 mg/ml. *R. officinalis* esetén: *S. aureus*: 0,25 mg/ml, *P. aeruginosa*: 2 mg/ml, *L. monocytogenes*: 0,5 mg/ml, *B. subtilis*: >2 mg/ml *E. coli*: 0,5 mg/ml *P. mirabilis*: 0,5 mg/ml.). Az antibakteriális hatásáról közzismert *Thymus* nemzetség képviselőinek illóolaja Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokkal szemben is gátló hatást fejtett ki (Ali et al., 2015; Goudjil et al., 2020). Pesavento és munkatársai (2015) a rozmarying, a fahéjkéreg, a kakukkfű, a zsálya és az oregánó illóolajainak antibakteriális hatását hasonlította össze agarlyuk diffúziós módszert alkalmazva. Tanulmányukból kiderül, hogy a kakukkfű illóolaja bizonyult a leghatékonyabbnak, valamint megállapították, hogy a zsálya illóolaja nem fejt ki antibakteriális hatást a *L. monocytogenes, S. aureus, S. enteritidis* és a *C. jejuni* ellen. Emellett fontos kiemelni, hogy az oregánó illóolaja bizonyult az egyik leghatékonyabbnak a *S. typhimurium, E. coli, B. cereus, P. aeruginosa* és *E. faecalis* mikroorganizmusokkal szemben (El Gendy et al., 2015; Boskovic et al., 2015). Míg a fahéjkéreg és mustár illóolaja külön-külön gátolta a *S. aureus, B. cereus, E. coli, P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida, P. carotovorum* és a *S. enterica* baktériumokat, szinergikus hatásuk csak az *E. coli* és a *P. putida* esetén érvényesült (Clemente et al., 2016).

Nemcsak mustár illóolajával állnak rendelkezésünkre illóolaj keverékek tesztelésével kapcsolatos adatok. A fahéjkéreg és szegfűszeg illóolajok szinergista hatást mutattak, hiszen együttes alkalmazásuk hatékonyabbnak bizonyult *S. aureus*, a *L. monocytogenes*, a *P. aeruginosa* és *S. typhimurium* ellen (Purkait et al., 2020). Bár a levendula illóolaja a kozmetikai iparban a legismertebb, jelentős antibakteriális hatással bír *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. vulgaris* baktériumok ellen (El Hamdaoui et al., 2018). Vitathatatlan a potenciál, amely az illóolajok antibakteriális hatásában rejlik (Mutlu-Ingok et al., 2020), így elengedhetetlenül fontos, további baktériumok illóolajokkal történő gátlásának vizsgálata.

## 2.4. A vizsgálatokba bevont légúti patogének jellemzése

A WHO 2015. évi felmérése alapján elmondható, hogy a légúti megbetegedések problémája hatalmas méreteket öltött, hiszen abban az évben világszerte 3,2 millióan veszítették életüket légúti megbetegedések miatt. Tuberkulózisban elhalálozók aránya ugyan 2000 és 2015 között csökkenő tendenciát mutatott, de még így is 2015-ben 1,4 millió áldozatot követelt. A HIV vírus okozta AIDS megbetegedés 1,1 millió ember halálát okozta, így a légúti megbetegedésekből adódó elhalálozások ehhez képest háromszor magasabb áldozati arányt mutattak (WHO 2015). Ezen adatok ismeretében elengedhetetlen a légúti megbetegedéseket okozó mikroorganizmusokat tanulmányozni és a velük szemben hatékony terápiás lehetőségeket felkutatni.

Vizsgálatainkba a leggyakoribb légúti megbetegedéseket eredményező kórokozókat vontuk be: *Haemophilus influenzae* (DSM 4690), *H. parainfluenzae* (DSM 8978), *Streptococcus pneumoniae* (DSM 20566), *S. mutans* (DSM 20533) és a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

### 2.4.1. *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*

A *Haemophilus* genus tagjai között mind emberi, mind állati patogének megtalálhatók. Előfordulnak egészséges egyének légútjaiban, bélcsatornájában, és a vagina nyálkahártyáján is (Ádám, 2013). Gram-negatív coccobacillusok, tenyésztésben időnként hosszú fonalakat vagy gömb alakokat is találunk. Csillójuk, spórájuk nincs, tokot képezhetnek (Gergely, 2003).

A *H. influenzae* egy pleomorf Gram-negatív coccobacillus, a genus legfontosabb humánpatogén tagja (Wen et al., 2020), amely a légúti nyálkahártya fertőzések, valamint az invazív bakteriális fertőzések (pl. agyhártyagyulladás) kialakulásáért tehető felelőssé (Wang et al., 2008; Whittaker et al., 2017). Gyakori a tünetmentes hordozás. Tenyésztéséhez X és V faktort igényel (Gergely, 2003; Ádám, 2013), csokoládé agaron tenyésztik, ahol apró csillogó telepeket képez (Gergely, 2003). Kizárólag humánpatogén baktérium. A felső légutakba bejutva vagy tünetmentes kolonizációt, vagy különböző klinikai képekben megnyilvánuló fertőzést okoz (Macfadyen, 1996; Ádám, 2013). A *H. influenzae* virulenciafaktora a tok (Roop et al., 2016). A törzsek szerológiai típusba sorolása (a-f) a tokantigén alapján történik. A tokantigén segíti a kolonizációt, véd a fagocitózistól. A külső membrán poliszacharidjai, fimbriák és a vaskötő proteinek az adherenciát, a kolonizációt segítő faktorok (Meats et al., 2003; Kostyanov & Sechanova, 2012). Virális fertőzés (influenza vagy más légúti vírus) elősegíti a *H. influenzae* légúti kolonizációját és az általa okozott betegség kialakulását. Invazív



kórformákat általában a *b poliszacharid* (poliribozil-foszfát) tokkal rendelkező törzsek okoznak (Whittaker et al., 2017). A leggyakoribb invazív megbetegedés a meningitis, amit sorrendben az epiglottitis, sepsis, pneumonia, septicus arthritis, cellulitis követ, leggyakrabban gyermekkorban (6 hónaptól 6 éves korig), idős korban, valamint terhesség alatt jelent kockázatot (Collins et al., 2014). A bacteraemia szövődménye ritkán pericarditis, endocarditis is lehet (Gergely, 2003). Az 1990-től Európában is bevezetett Hib konjugált oltás a fertőzés esetszámának csökkenését eredményezte (Zielen et al., 1992; Adams et al., 1993). Fertőzés esetén, az antibakteriális kezelés során figyelembe kell venni az izolátumok gyakori  $\beta$ -laktamáz - (főként az ún. TEM-1 enzim)- termelő képességét (Tristram et al., 2010), amelyen a  $\beta$ -laktámokkal szemben rezisztenciát mutatnak (Clairoux et al., 1992; Tsang et al., 2017). A leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok közé a cefotaxim vagy ceftriaxon tartozik (Ádám, 2013; Schotte et al., 2019). Néhány tanulmány beszámolt a *H. influenzae* biofilm képző tulajdonságáról, amelyet nagymértékben meghatároznak a pilusok, a fehérjék, valamint a bakteriális DNS állomány (Murphy & Kirkham, 2002; Webster et al., 2006; Unal et al., 2012; Vogel et al., 2012). A *H. influenzae* által okozott biofilmek leginkább középfülgyulladásban, valamint COPD betegségben szenvedőknél okoz kiemelten fontos problémát, hiszen a *H. influenzae* biofilmek kitapadásának következtében a baktérium ellenállóságának fokozásának eredményeképp, az antibiotikummal történő kezelés nem eredményez gyógyulást (Brown & Gilbert, 1993; Mohd-Zain et al., 2012).

A *H. parainfluenzae*, egy Gram-pálca (Pál, 2013), amely a normál szájflóra tagja (Ádám, 2013) és urogenitális traktus (Murphy, 2015) tagja, az okozott betegségek skálája hasonló a *H. influenzae* baktériumhoz (Gergely, 2003). Jelentőségét elsősorban az adja, hogy ún. HACEK csoport (*Haemophilus*, *Actinobacillus* (újabbán *Aggregatibacter*), *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*) tagjaiként szívbelhártya-gyulladást okozhatnak (Pál, 2013; Feder et al., 2003). Tenyésztéséhez csak V faktor szükséges (Ádám, 2013), tipikusan lassan növekvő baktérium, nyálkahártya kolonizálásához átlagosan öt napra van szükség (Darras-Joly et al., 1997; Duzenli et al., 2017). A *H. parainfluenzae* kolonizálja a légutakat, meningitis, sinusitis, epiglottitis, pneumonia kialakulásáért felelős (Pillai et al., 2000), emellett az ízületi gyulladásokban is szerepet játszik nyálkahártya degradáció révén (Smith et al., 1976; Blair et al., 1977; Darras-Joly et al., 1997; Dubost et al., 2000). Továbbá súlyosbítja a COPD-ben szenvedő betegek tüneteit (May et al., 1953; Middleton et al., 2003). A *H. parainfluenzae* biofilm képződéséről nem áll rendelkezésünkre sok adat, viszont vizsgálatok támasztják alá, hogy az ízületi felszínnek területén képes biofilmet létrehozni, ezzel megnehezítve a kezelést

(Kosikowska & Malm, 2009; Cobo et al., 2017). Mindemellett *H. parainfluenzae* biofilmet detektáltak az orrnyálkahártya és a garat felszínén (Kosikowska et al., 2015). A nyálkahártya felszínén létrejött *H. parainfluenzae* biofilm sokkal ellenállóbb az antibiotikummal történő kezelésnek, így a fertőzés megjelenése hosszantartó elváltozásokat vonhat maga után (Rodriguez et al., 1990; Ye et al., 2013; Kosikowska et al., 2016; Pang & Swords, 2017), hiszen a fertőzés sok esetben krónikussá vagy visszatérő jellegűvé válik. *In vitro* *H. parainfluenzae* biofilm vizsgálatok támasztják alá, hogy ez a baktérium olyan biofilm közösséget képes alkotni, amelyekben belül a polimer mátrix főként extracelluláris DNS-ből és fehérjékből áll (Bakaletz, 2009; Pang & Swords, 2017).

#### **2.4.2. *Pseudomonas aeruginosa***

A genus több mint 200 fajt foglal magába (Gergely, 2003), amelyek döntő többsége a talajban és a természetes vizekben élő szaprofiták (Remold et al., 2011; Ádám, 2013). Gram-negatív, spórát és tokot nem képző, poláris csillókat hordozó pálcák (Gergely, 2003). Obligát aerob baktériumok, metabolizmusuk során az energiát cukrok oxidációja útján nyerik, ezért nem fermentáló baktériumoknak is nevezik. Oxidáz pozitívak (Ádám, 2013). Mint ubikviter szaprofiták, növekedésükhöz nem igényelnek különleges feltételeket, egyszerű táptalajon jól szaporodnak. A *P. aeruginosa* orvosi mikrobiológia szempontjából legjelentősebb a fenti genusba sorolt mikroorganizmusok között (Gergely, 2003). A *P. aeruginosa* opportunista kórokozó, amely mind a környező természetben, mind az emberi szervezetben nem ritkán megtalálható, de betegséget többnyire csak valamilyen hajlamosító tényező jelenlétében okoz (Bahramian et al., 2019). Jelenleg az egyik legveszélyesebb, ha nem a legveszélyesebb multirezisztens nosocomialis kórokozó (Gergely, 2003; Shariati et al., 2018). Megjelenésükben a telepek rendkívüli változatosságot mutatnak. Leggyakoribb a lapos, szabálytalan szélű, áttűnő telep, de nyákos küllemű kolóniák is képződhetnek a termelt exopoliszacharidok következtében (Gergely, 2003). A tenyészeteknek jellegzetes, édeskés hársfavirág illata van. Véres agaron jellemző az erős  $\beta$ -hemolízis. A *Pseudomonas*-fertőzések a számos, együttesen ható virulenciafaktornak köszönhetőek, amelyek közül egyesek az invazív készséget növelik, mások valódi toxinként hatnak, megint mások a szervezet védekező hatásmechanizmusainak hatásosságát csökkentik (Gergely, 2003; Mah et al., 2003; Bahramian et al., 2019). Nyálkaanyagai, mint pl. az alginát a biofilm növekedési formában játszanak szerepet (Gergely, 2003). A baktérium által okozott betegségek esetén gyakoriság tekintetében első helyen állnak a légúti fertőzések: cystitis, bronchopneumonia. További klinikai megnyilvánulások a melléküreg-gyulladások, középfülgyulladás, mastoiditis és meningitis (Kunert et al., 2007).

Cysticus fibrosis esetében szintén nagy jelentősége van a *P. aeruginosa* fertőzésnek (Ádám, 2013). Ezen betegségben a baktérium az általa termelt nyákban és a hialin membránba ágyazottan biofilm formában növekszik, a celluláris és humorális védekezés, valamint az antimikrobás szerek számára egyaránt nehezen hozzáférhető formát veszi fel (Gergely, 2003; Høiby et al., 2010b). Mivel vizes oldatokban szaporodik, könnyen fertőzheti a lélegeztető- és altatókészülékeket, intravénásan adandó oldatokat, desztillált vizet (Ádám, 2013). A fent említett fertőzéseken kívül okozhat lábszárfekélyt, hosszú fekvés következtében kialakuló fekélyes elváltozásokat, ún. felfekvéses fertőzéseket, a bőr necrosissal járó károsodását, valamint szaruhártya fertőzést is. Mivel a *P. aeruginosa* multirezisztens baktérium, minden egyes izolátum antibiogramjának megfelelő szereket kell alkalmazni (Vakulenko et al., 2003; Ádám, 2013; Chegini et al., 2020). Terápiásan antispeudomonas penicillinek (ticarcillin vagy piperacillin) kombinálva aminoglikozidokkal (gentamicin vagy amikacin), vagy harmadik generációs Pseudomonasra is ható cefalosporinok jöhetnek szóba (Wagner et al., 2008; Breidenstein et al., 2011; Ádám, 2013). A krónikus fertőzések kialakulásában kiemelkedő szerepet játszik a baktérium intenzív biofilm képző tulajdonsága (Costerton et al., 1999; Mah et al., 2003; Vakulenko et al., 2003; Chegini et al., 2020), hiszen így a *Pseudomonas* biofilm tízszer, de akár ezerszer fokozottabb ellenállást mutat az antibiotikumokkal, fertőtlenítő szerekkel szemben (Stewart & Costerton, 2001; Chegini et al., 2020). Jelenleg kutatások irányulnak a *P. aeruginosa* biofilm fágterápia segítségével történő visszaszorítására (Guttman et al., 2005; Potera, 2013; Harper et al., 2014; Chegini et al., 2020).

#### **2.4.3. *Streptococcus pneumoniae*, *S. mutans***

A *Streptococcus* nemzetségbe fakultatív aerob és anaerob, nem mozgékony Gram-pozitív, gömb alakú, kissé ovális baktériumok tartoznak. A *S. pneumoniae* szerepét Fränkel és Weichselbaum ismerték fel, akik megállapították, hogy e mikroorganizmus a lobaris pneumonia (lebenyes tüdőgyulladás) leggyakoribb kórokozója (Rozgonyi, 2003; Hammerschmidt 2006; Suaya et al., 2020). Továbbá gyakori okozója nyálkahártya fertőzéseknek, mint az otitis média, sinusitis, pneumonia, sepsis és meningitis (et al., 2012). A *S. pneumoniae* legfontosabb kórokozója a közösségben szerzett tüdőgyulladásnak, amely magas halálozással járó súlyos betegség (O'Brien et al., 2009; File et al., 2010; WHO, 2015). 2013-ban, világszerte, évente mintegy 1,6 millió halálesetért volt felelőssé felelőssé a kórokozó, és még a fejlett országokban is a kórházi ellátást igénylő, közösségben szerzett tüdőgyulladások legalább egyharmadát a pneumococcus okozta. A *S. pneumoniae* fertőzésben elhunytak száma

2019-ben már 2 millióra tehető (Yu et al., 2019) Különösen a 2 év feletti gyermekek és idősök veszélyeztetettek (Pál, 2013; Chao et al., 2015). Virulencia faktorai sokrétűek: A kolin kötő fehérjéje (pneumococcal surface adhesin A), a neuramidáz, és az IgA1 proteáz lehetővé teszi nyálkahártyához történő hozzátapadást, valamint csökkenti a nyák viszkozitását, megnehezítve így azok köhögés révén történő eltávolítását. A baktérium pneumolizint citotoxikus, és gátolja a légúti hám csilióinak mozgását, jelentősen károsítva az alsó légutak természetes tisztító mechanizmusait (Pál, 2013). Virulencia faktorai továbbá a poliszacharidok, a hialuronát-liáz, az autolizín, valamint a fonálszerű pilusai (Lauer et al., 2005; Mora et al., 2005; Záhner et al., 2010; Fu et al., 2019; Dzarali et al., 2020). A *S. pneumoniae* fertőzések kezelésében, hagyományosan, a  $\beta$ -laktám antibiotikumok, elsősorban a penicillin, cefalosporinok, allergia esetén pedig a macrolidok, az újabb fluorokinolonok használatosak, ám ezek gyakori mellékhatásai miatt az Európai Gyógyszerügynökség és az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala korlátozást vezetett alkalmazásuk tekintetében. Az antibiotikum túlhasználatnak köszönhetően, mára már jelentősen megnőtt a rezisztens törzsek száma (Lynch et al., 2009). A rezisztens törzsek által okozott súlyos fertőzések kezelésében a vancomycin valamint a fent említett antibiotikumok kombinált alkalmazása játsza a vezető szerepet (Weiss et al., 2004; Pál, 2013). A *S. pneumoniae* biofilm első megemlítése Budhani és Struthers nevéhez fűződik (1997), a biofilm képzésével, strukturális felépítésével és visszaszorításának lehetőségeivel egyre több tanulmány foglalkozik (Allegrucci et al., 2006; Greenberg et al., 2006; Park et al., 2018; Yadav et al., 2020). Tanulmányok támasztják alá, hogy a leggyakrabban gyermekeknél kialakuló visszatérő középfülgyulladás hátterében az áll, hogy a hallójáratok nyálkahártya hámszövetén letapadt *S. pneumoniae* visszaszorítása az antibiotikus kezelés hatására sem valósul meg (Hall-Stoodley et al., 2006; Coates et al., 2008; Hoa et al., 2009; Nistico et al., 2011; Domenech et al., 2012). Emellett megfigyelhető, hogy *S. pneumoniae* okozta fertőzés esetén a tüdő bizonyos területein biofilm struktúrák figyelhetők meg (Sanchez et al., 2010; Domenech et al., 2012).

A *S. mutans* fakultatív anaerob, Gram-pozitív baktérium (Loesche, 1996; Ryan et al., 2004), amely a szájüreg valamint a torok, és a garat jellemző patogénje, a szájüregben általánosan megtalálható *Streptococcusok* 39%-át teszi ki (Ikeda et al., 1971; Liao et al., 2017). Jellemzőjük, hogy morfológiájuk megegyezik a *Streptococcusok*éval, nem mozognak, kataláz negatívak. Leggyakrabban a fogszuvasodás kialakulásával hozzák összefüggésbe (Meurman, 1988; Yamashita et al., 1993; van Loveren, 2001). Virulencia faktora maga a biofilm képző képessége, valamint a sejtfelszíni adhezin (antigén c), amely elősegíti a baktériumsejtek

letapadását (Kawabata & Hamada, 1999; Banas & Vickerman, 2003; Matsumoto-Nakano, 2018), továbbá a glükán kötő fehérjék, tejsav termelés, és az alacsony pH értékű helyeken való kolonizáció (Krzyściak et al., 2014; Cortes et al., 2021). A kórokozó oly mértékben képes kötődni a fogak felszínéhez, hogy azok elvesztése esetén eltűnnek a szájflórából (Filoche et al. 2004). A szájüreg mellett jelentős problémákat okozhat a kardiovasculáris rendszerben is, hiszen a szívbelhártya gyulladás valamint a szívbillentyű gyulladás kialakulásáért felelős patogének közé tartozik (Nakano et al., 2006; Lemos et al., 2019; Cortes et al., 2021). A *S. mutans* az egyik legjelentősebb biofilm képző szájüregben megtalálható baktérium. Biofilm képződési sikerének hátterében az áll, hogy képes nagymennyiségű extracelluláris glükán polimert szintetizálni szacharózból, amely elősegíti a fogak felszínén kialakított biofilm tartósságát. Biofilm képzése révén ellenállást mutat mind a fertőtlenítő szerekkel, antibiotikumokkal mind pedig a kedvezőtlen körülményekkel szemben. Ennek köszönhetően rendkívül savas környezetben is képes kolonizálni (Lemos et al., 2008; Cortes et al., 2021). A szájüreg mellett megtalálható az orrgarat területein is, ahol gyulladós folyamatokat képes indukálni (Könönen et al., 2002).

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. A vizsgálatokban felhasznált illóolajminták

Felső légúti megbetegedések esetén gyakran alkalmazzák a borsmenta és kakukkfű illóolajokat (Ph. Hg. VIII, Bylka et al. 2012, Gurib-Fakim 2006, Edris 2007). Korábbi mikrobiológiai vizsgálataink alapján azt tapasztaltuk, hogy a fahéjkéreg és a szegfűszeg illóolajok is antimikrobás hatással rendelkeznek (Ács, 2018), illetve nagyon népszerűek a felhasználók körében párologtatás céljából. Vizsgálatainkat ezért e négy illóolaj bevonásával végeztük el. Az illóolajokat kereskedelmi forgalomból (Aromax Zrt.) szereztük be. Gyártási számok: borsmenta, H7101/1601; kakukkfű, H3981/1509; fahéjkéreg, I3201/1609; szegfűszeg, H7352/1602.

#### 3.2. Illóolajok kémiai összetételének meghatározása

Az illóolajok kémiai összetevőinek vizsgálatára a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv gázkromatográfiás vizsgálatot ír elő (Ph. Hg. VIII). A gázkromatográfiás méréseket Dr. Böszörményi Andrea, a Semmelweis Egyetem GYTK Farmakognóziái Intézetének munkatársa végezte el számunkra. GC-MS (gázkromatográfia tömegspektrométerrel kapcsolva) és GC-FID (gázkromatográfia lángionizációs detektorral kapcsolva) készülékekkel dolgoztunk. Az összetétel meghatározásához a komponensenként kapott retenciós időket és a tömegspektrumokat vettük figyelembe, amelyeket standardok értékeivel, valamint a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottunk össze. A százalékos értékek meghatározásához területnormalizációt alkalmaztunk (Adams, 2001). A GC-MS és GC-FID mérések paramétereit a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat A GC-MS és GC-FID analízisek paramétereit

	GC-MS	GC-FID
<i>Készülék:</i>	Agilent 6890N	Fisons 8000
<i>Oszlop:</i>	30 m x 0,25 mm i.d, Agilent SLB-5MS (film vastagság 0,25 µm)	30 m x 0,25 mm Rt-β- DEXm (film vastagság 0,25µm)
<i>Program:</i>	60°C 3 perc, 8°C/perc 60-250°C, 250°C 1 perc	8°C/perc 60-230°C, 230°C 5 perc

<i>Vivőgáz:</i>	nagy tisztaságú hélium 6.0, 1.0 ml/perc, (37 cm/s), constant flow mode	nitrogén, 6,8 ml/perc
<i>Injektor:</i>	250°C	210°C
<i>Injektálás:</i>	Split arány 1:50	0,2 ml, 0,1% oldat, splitless
<i>Detektor:</i>	5973N (MS)	FID, 240°C

### 3.3. Mikrobiológiai vizsgálatok

A baktériumok tenyésztése az alábbi körülmények között zajlott: *Haemophilus influenzae* (DSM 4690) és *H. parainfluenzae* (DSM 8978) törzsek esetén speciális tápoldatot használtunk. 3750 µl Mueller-Hinton II Broth (Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft.) táptalajhoz 500 µl *Haemophilus* supplement B-t (Diagon Kft.) és 750 µl (1 mg/ml) NAD oldatot adtunk. A *Streptococcus pneumoniae* (DSM 20566), *S. mutans* (DSM 20533) és *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) esetében Brain Heart Infusion Broth (Sigma-Aldrich Kft.) táptalajt alkalmaztunk (Balázs et al., 2019). A vizsgálatban részt vevő baktériumokat az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat A vizsgálatok részét képező baktériumok

<b>A mikrobiológiai vizsgálatokban részt vevő baktériumok</b>	
baktérium	származási hely
<i>H. influenzae</i>	Németország
<i>H. parainfluenzae</i>	Németország
<i>P. aeruginosa</i>	USA
<i>S. pneumoniae</i>	USA
<i>S. mutans</i>	USA

### 3.3.1. Bioautográfias vizsgálatok

A bioautográfia egy posztkromatográfias detektálási módszer, amely többek között komplex kivonatok antimikrobás hatásának vizsgálatára ad lehetőséget (Botz et al. 2001). A mikrobiológiai kísérleteket a PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében végeztük el.

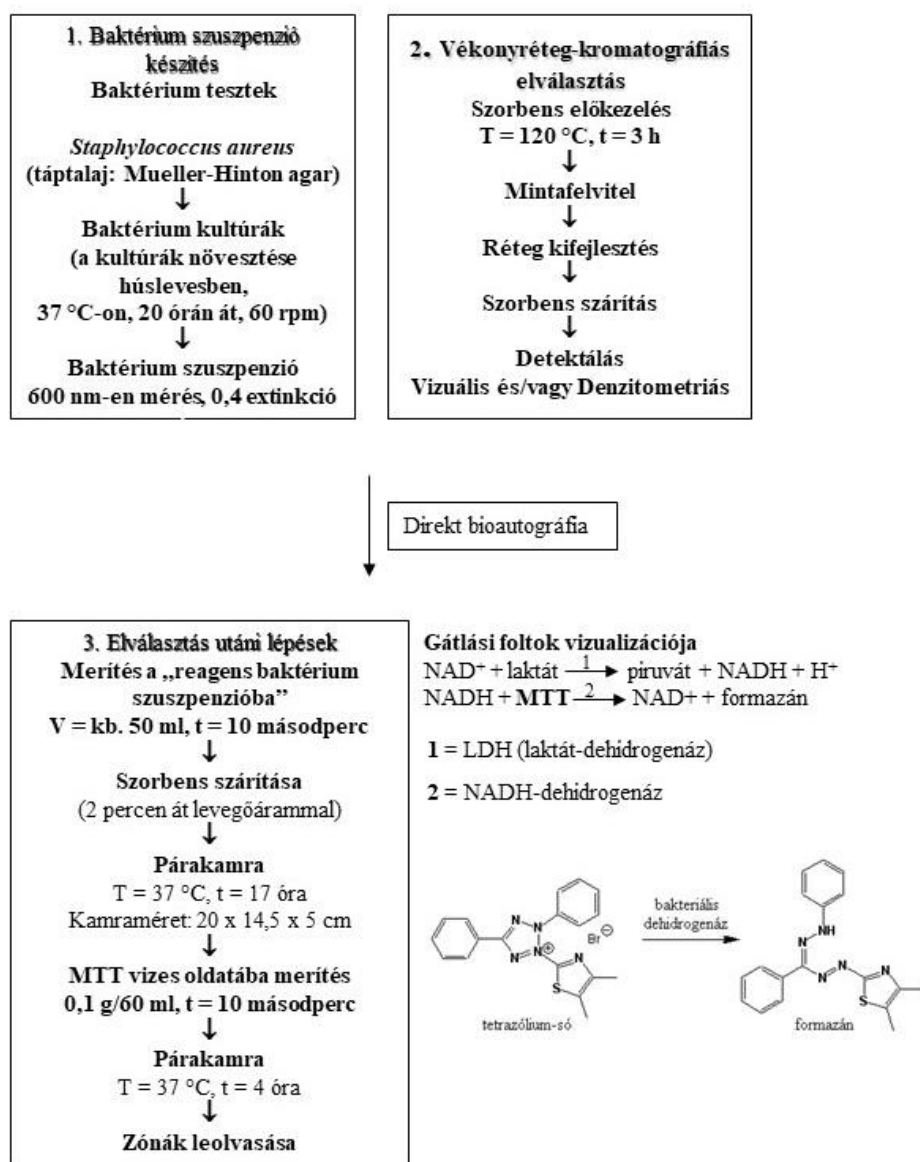
Vizsgálatunk során direkt bioautográfias módszer segítségével detektáltuk az illóolajok és főkomponenseik baktériumokra kifejtett gátlását. A rétegen kialakult gátlási zóna megfelel az általunk vizsgált anyag antibakteriális hatásának. Első lépésként a vizsgálandó anyagot (antibiotikum, illóolaj, illóolaj komponens) juttattuk fel Finnpipette típusú pipetta segítségével a méretre vágott (10 x 5 cm) szilikagél rétegekre (Merck TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>). Az illóolaj törzsoldata 200 mg/ml volt, abszolút etanolban oldva, amelyből 0,5 és 1 µl-t juttattunk a rétegre. Az illóolajok főkomponenseit (eugenol-szegfűszeg, fahéjaldehyd-fahéjkéreg, mentol-borsmenta, timol-kakukkfű; Sigma Aldrich Kft.) 20 mg/ml-es törzsoldatból vittük fel a rétegekre, mindegyik standard esetén 0,5 µl-t. Pozitív kontrollként amikacint alkalmaztunk (Likacin 250 mg/ml oldatos injekció, Lisapharma S.p.A.), a *Streptococcus*, valamint a *Pseudomonas* törzsek esetén, amelyből 0,4 µl került a rétegekre. *Haemophilus* törzsek gátlásának érdekében pozitív kontrollként gentamicint használtunk (Sandoz 40 mg/ml oldatos injekció, Sandoz), amelyből 2,5 µl-t vittünk fel a rétegre. Az oldószer aktivitásának kizárása érdekében 0,5 µl abszolút etanolt vittünk fel a rétegekre.

Az összillóolaj vizsgálat (amikor nem történt meg a réteglapok kifejlesztése) mellett kíváncsiak voltunk arra, hogy az illóolajok komponensei közül melyek rendelkeznek antibakteriális hatással. Ennek érdekében kifejlesztést végeztünk (kifejlesztőszer: borsmenta, kakukkfű, szegfűszeg illóolaj esetén: toluol:etil-acetát 95:5 (v/v); fahéjkéreg illóolaj esetén: diklórmétán). A mikrobiológiai vizsgálatnak alá nem vetett rétegeket 256 nm-en detektáltuk (Camag UV lámpa), valamint vanillin-kénsav előhívó segítségével (Wagner & Blandt, 1996), 105°C-on történő inkubálást (5 perc) követően látható fényben is értékeltük. A mikrobiológiai vizsgálatokat az elő nem hívott rétegekkel végeztük el.

A mikrobiológiai vizsgálatok első lépése a csíraszám ( $4 \times 10^7$  CFU/ml) pontos beállítása optikai denzitásmérés segítségével 600 nm-en. Ezt követően a rétegeket a baktérium szuszpenzióba mártottuk, majd száradás után pára kamrában inkubáltuk őket (37°C, 3 h). Ezt követően MTT festék vizes oldatát [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium-bromid] (MTT, 0,05 g/90 ml) (Sigma-Aldrich Kft.) alkalmaztunk a gátlási zónák láthatóvá tételének érdekében. A gátlási zónák vizualizációja a baktérium dehidrogenáz aktivitása alapján történik. A



metabolikusan aktív baktérium átalakítja a tetrazolium sót kék formazan festékké (2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium klorid) (Botz et al. 2001). Így a vizsgálati anyagok által gátolt területeken a gátlási zónák fehér színűek maradtak, jelölve a baktériumok hiányát. A rétegek fotózását követően (Leica, Vario-Summilux-H1) a gátlási zónák átmérőjének mérése (összillóolaj rétegek esetén) Motic Images 2.0 programmal történt. Az adatok további elemzéséhez Excel programot használtunk. A bioautográfias vizsgálat folyamatát az 3. ábra mutatja be.



3. ábra A bioautográfias vizsgálatok sematikus ábrája

Annak érdekében, hogy pontos képet kapjunk arról, hogy mely komponensek eredményeznek mikrobiológiai hatást, a gátlási zónákat képező komponenst / komponenseket preparatív kromatográfiás vizsgálatnak vetettük alá. A gátlási zónákat eredményezett sávokat Rf értékek és vanillin-kénsavval adott színreakció alapján azonosítottuk. Ezután az illóolaj mintákat 10 µl (törzsoldat: 200 mg/ml) mennyiségben felvittük a vékonyrétegre, kifejtést követően a szilika réteget megfelelő zónákban lekapartuk (előzőleg meghatározott Rf értékek alapján), majd a frakciókat külön üvegbe gyűjtöttük. A mintákat a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetében elemezték a 4.2. fejezetben leírtak alapján.

### 3.3.2. Minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása

A minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározása mikrodilúciós módszer segítségével történt 96 cellás mikrotiter lemezekon (Kerekes et al., 2013). Minimális gátló koncentrációként határoztuk meg az illóolaj azon legkisebb koncentrációját, amely az inkubációs idő letelte után, a kontrollhoz viszonyítva >90%-ban volt képes a baktérium szaporodását gátolni.

A megfelelő csíraszám ( $10^5$  CFU/ml) beállítását követően mind a baktériumszuszpenzióból, mind pedig a vizsgált illóolajból 100-100 µl mennyiséget mértünk a mikroplate lyukaiba. A vizsgálati anyag tápoldatban oldva került hozzáadásra. Az illóolaj mintákat háromféle módszerrel készítettük elő. A vizes bázisú baktériumszuszpenzióba történő oldáshoz Tween80 emulgenst (1%), abszolút etanolt, valamint Pickering-emulziót használtunk. Így minden illóolaj minta esetében mindhárom típusú oldattal hat ismétléssel végeztük el a vizsgálatokat. A vizsgálati minta hozzáadását követően, inkubálás után (24 óra, 37°C) 600 nm-en abszorbanciát mértünk (BMG Labtech, Bio-Tek Kft.). Az illóolajokat nem tartalmazó sejtuszuszpenziós tápoldat szolgált pozitív kontrollként, és a sejtmentes, illóolaj-tartalmú tápoldat negatív kontrollként. A széli hatás kiküszöbölése érdekében a mikroplate keretét alkotó legszélső lukakat nem használtuk. A hat párhuzamosból átlagot számoltunk, majd a negatív kontroll átlagát kivontuk a kapott értékből. Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol a pozitív kontroll abszorbanciájához képest  $\pm 10\%$ -ra csökkent értékeket mértünk. Pozitív kontrollként antibiotikumokat alkalmaztunk. *P. aeruginosa* esetében gentamicin (Gentamicin Sandoz 80 mg/ 2ml injekció, Sandoz), *S. pneumoniae* esetén imipenem (Imipenem/Cilastatin Kabi 500 mg/500 mg por oldatos infúzióhoz; törzsoldat: 0,4 mg/ml), *S. mutans* esetén amoxicillin/klavulánsav (Aktil 1000 mg/200 mg por oldatos infúzióhoz, Richter Gedeon) és a

*Haemophilus* törzsek esetén amikacin (Likacin 250 mg/ml oldatos injekció, Lisapharma S.p.A.) antibiotikumokat alkalmaztunk.

### **3.3.3. Pickering emulziók előállítás**

A szilika nanorészecskék által stabilizált, illóolaj tartalmú O/W (Oil/Water, azaz olaj a vízben) típusú Pickering emulziók elkészítését a PTE GYTK Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézet munkatársai készítették el számunkra a következő leírás alapján (Horváth, 2021). Első lépésben 20 nm nagyságú, hidrofil szilika nanorészecskéket állítottak elő Stöber szintézissel. A megfelelő stabilitás eléréséhez előzetes kísérleti munka alapján, etil funkció csoportokkal végezték el a szilika nanorészecskék felületi módosítását (20ET). Az emulziók formulálásához először elkészítették a 20ET nanorészecskék vizes szuszpenzióját, majd hozzáadták a megfelelő mennyiségű illóolajat. 2 perc ultrahangos előemulgeálást követően, UltraTurrax (IKA Werke) készülékkel 13500 1/min sebességgel homogenizálták az emulziókat. Az így elkészült Pickering emulziók cseppméretét DLS méréssel (Malvern Zetasizer NanoS) határozták meg, stabilitásuk megállapításához időben követték a cseppméret változását. A biofilm gátláshoz használt Pickering emulziók mindegyike legalább 1 hétig stabil volt. A stabilitás vizsgálat eredményeit a melléklet 9.3. pontja tartalmazza.

Konvencionális emulziókat is készítettek a fentiekkel analóg módon, amelyeknek szintén vizsgálták a cseppméretét és stabilitását. Ez esetben az emulziók stabilizáló ágense Tween80 (Polysorbate80) felületaktív anyag volt. Negatív kontroll vizsgálatuk részét képezte az abszolút etanos, Tween 80-as és Pickering emulziók illóolaj nélküli, önálló alkalmazása. Minden mérésből hat párhuzamost végeztünk el.

### **3.3.4. Illóolajok és komponenseik biofilm-képződésre kifejtett hatásának vizsgálata**

A biofilmek (biohártyák) élő vagy élettelen felületen összetapadt mikroorganizmus közösségek, amelyek ilyen formában sokkal ellenállóbbak a kedvezőtlen körülményekkel szemben (Hoiby, 1977). A bakteriális biofilmeket 96 cellás polisztirol mikrotiter lemezeken (VWR, International Kft., Debrecen, Hungary) alakítottuk ki. Egy cellába 200 µl 10<sup>8</sup> CFU/ml sejtszámú sejtsuszpenziót mértünk. Inkubációt (4 h, 37°C) követően a le nem tapadt sejteket fiziológiás sóoldattal (9 g NaCl, 1000 ml desztillált víz) kimostuk, és a letapadt sejtekhez hozzáadtuk a vizsgálni kívánt mintát. Inkubálást követően (24 h, 37°C) fiziológiás sóoldatos mosás után minden mintahelyre 200 µl 99<sup>v</sup>/<sub>v</sub>%-os metanolt mértünk. 15 perc várakozás után 200 µl 0,1%-os kristályibolya oldatot mértünk a cellákba. 20 perc elteltével a biofilmekhez

kötődött festéket 33%-os ecetsav-oldattal kioldottuk és 595 nm-en abszorbanciát mértünk (BMG Labtech, Bio-Tek Kft.) plate reader segítségével. A kristályibolya kapcsolódik a biofilmek extracelluláris mátrixán belüli negatív töltésű felületi molekulákhoz és poliszacharidokhoz, így lehetővé teszi a biofilm teljes biomasszájának mérését a mikrotiter lap cellájában (Peeters et al., 2008). Az illóolajokat MIC/2 koncentrációban alkalmaztuk.

### **3.3.5. Biofilmek vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével**

A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok előkészítése során a biofilmeket zsírtalanított fedőlemezeken alakítottuk ki. A  $10^8$  CFU/ ml sejtszámú szuszpenzióban a fedőlemezeket 4 órán át inkubáltuk (37°C). Négyórás tapadást követően a lemezeket átmostuk fiziológias sóoldattal, majd az előző kísérletekben hatásosnak bizonyuló illóolajokat alkalmaztuk gátlószerként MIC/2 koncentrációban. Pozitív kontrollként kezeletlen mintákat használtunk, ahol tápoldattal fedtük be a tárgylemezeket. 24 órát követően a tápoldatokat eltávolítottuk, a le nem tapadt sejteket fiziológias sóoldattal eltávolítottuk, majd előkészítettük a mintákat a SEM protokollnak megfelelően. A mintákat a biofilm rögzítése céljából 2,5% glutáraldehidben (Molar Chemicals Kft., Halásztelek) szobahőmérsékleten 2 órát inkubáltuk, majd 50%, 70%, 80%, 90% és abszolút etanollal 2x15 perces időtartamokban víztelenítettünk. A fedőlemezeket ezután tercier butil alkohol: abszolút etanol 1:2, 1:1, 2:1 arányú keverékébe, majd abszolút tercier-butil-alkoholba helyeztük 1-1 órára, szobahőmérsékleten. A mintákat végül abszolút tercier-butil-alkoholban 4°C-on fagyasztottuk, és egy éjszakán át fagyasztva szárítottuk. A mintákat rögzítettük, majd a szükséges aranyréteg felvitelét követően (Quorum Technologies SC 7620 'Mini') a mintákat Hitachi S4700 pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk (Kerekes et al., 2013). A vizsgálat a SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén zajlott.

### **3.3.6. A quorum sensing (QS) mechanizmus vizsgálata**

Az anti-quorum sensing (anti-QS) hatás kimutatása érdekében papírkorong diffúziós módszert alkalmaztunk. A quorum sensing mechanizmus gátlása jól szemléltethető a pigmentet termelő baktériumokkal, ezért *Chromobacterium violaceum* (SZMC 6269) modellbaktériummal végeztük el a vizsgálatainkat. A QS gátlás kimutatása érdekében korábban *C. violaceum* 85 WT törzssel leoltott és beszárított BHI táptalajt tartalmazó Petri csészékre 6

mm átmérőjű steril szűrőpapír korongokat helyeztünk. Ezekre 2 µl tömény illóolajat (borsmenta, fahéjkéreg, kakukkfű, szegfűszeg) vittünk fel, emellett 2,5 és 10 mg/ml-es hígításokat is készítettünk, amelyből szintén 2 µl került a korongokra. Továbbá kíváncsiak voltunk az illóolajok főkomponenseinek aktivitására is, ezért 10 mg/ml-es törzsoldatokat készítettünk mind a négy illóolaj legnagyobb mennyiségben detektált főkomponenséből (borsmenta-mentol, fahéjkéreg-fahéjaldehyd, kakukkfű-timol, szegfűszeg-eugenol), amelyekből 2 µl került a korongokra (Kerekes et al., 2013; Kerekes, 2017). Mind a hígított illóolajok, valamint a főkomponensek esetében is az oldószer abszolút etanol (Molar Chemicals Kft.) volt, így negatív kontrollként abszolút etanollal átitatott papírkorongokat alkalmaztunk. A papírkorongok körül két körkörös zóna kialakulását figyelhettük meg mind a négy vizsgálati anyag esetében. A belső terület egy teljes feltisztulási zónának mondható, hiszen nem detektálhattunk baktériumsejteket az adott területen, míg a külső zónában a baktérium növekszik, de a pigment termelés gátlást mutat. A depigmentáltság okozta színtelen zónákat mértük (mm), ugyanis a baktérium színanyag termelése QS szabályozás alatt áll. A kezeléseket hat párhuzamos méréssel végeztük (Kerekes, 2017).

## 4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### 4.1. A vizsgált illóolajok kémiai analízise

Az illóolajok kémiai összetételének meghatározása különösen fontos, hiszen a fő-, és mellékkomponensek arányát nagymértékben befolyásolja az anyanövényre ható, különböző környezeti tényezők változása, mint például a hőmérséklet ingadozása, a csapadék mennyisége, valamint a tápanyagellátottság. Ennek fényében ugyanazon növényfaj, ugyanazon szervéből (gyökér, szár, levél, kéreg, virág) különböző összetételű illóolajok nyerhetők ki, amelyekben a komponensek aránya változó. A legtöbb illóolaj esetében leginkább kiemelkedő antibakteriális tulajdonsággal a főkomponens rendelkezik, így ennek az illóolaj elegyen belüli mennyisége jelentős befolyásoló hatással bír. Nem szabad figyelmen kívül hagyni azonban, hogy sok esetben az illóolaj minor komponensei erősítik a főkomponens biológiai aktivitását, antibakteriális és biofilm ellenes hatását. Így kijelenthető, hogy az illóolajok sikeres antimikrobás szerként való alkalmazása komplex összetételükben rejlik. Éppen ezért elengedhetetlenül fontos a vizsgált illóolaj minták analitikai elemzése.

Vizsgálataink során az illóolaj mintáink direkt folyadék injektálása történt. Az analízisek során GC-MS és GC-FID detektorokat alkalmaztunk. A különböző detektorok segítségével történt mérési eredmények minimális eltéréssel összecsengenek. Az illóolajok komponenseit és a különböző detektorokkal történt mérés százalékos arányait az 6. és 7. táblázat foglalják össze, amelyekben az 1% feletti komponenseket tüntettük fel. Az analízis során detektált retenciósidőket, az 1% alatti komponensek százalékos arányát a melléklet 9.1. alfejezete tartalmazza.

A folyadék injektálás során történő MS detektorral történő analízisből a következő eredményeket állapítottuk meg. A borsmenta főkomponense az 50,4%-ban jelen levő mentol, emellett nagyobb mennyiségben figyelhetünk meg a mintánkban mentont (19,8%) is. Mindamellett, hogy ez a két komponens jelentős mértékben felel a borsmenta illóolaj biológiai aktivitásáért, jellegzetes illatát is ezek az összetevők adják. Minor komponensek közül kiemelendő az izomenton (7%), az 1,8-cineol (5,5%), valamint a mentil-acetát (5,5%). A fahéjkéreg illóolaj főkomponense a *transz*-fahéjaldehid, amely 64,7%-ban volt jelen. A szegfűszeg illóolaja mindössze hét komponensből állt, legnagyobb mennyiségben eugenolt (78,8%) tartalmaz, emellett fontos megemlíteni a  $\beta$ -kariofillént, amelyet 13,5%-ban detektáltunk. További minor komponensei közé az  $\alpha$ -humulén (4,6%), a  $\beta$ -kadinén (1,1%) sorolhatók. Az általunk vizsgált illóolajok közül leginkább összetettnek a kakukkfű illóolaja mondható, hiszen több mint húsz komponens detektáltunk a mintában. Főkomponensei a timol (39,8%) és a *p*-cimol (19,2%). Minor komponensként az  $\alpha$ -terpinén (3,2%), a  $\gamma$ -terpinén (6,7%),

a linalool (5,6%), a karvakrol (5,9%), és a  $\beta$ -kariofillén (4,2%) említhetők meg. Eredményeink összecsengenek az irodalmi adatokban foglaltakkal. Megállapítottuk, hogy a vizsgálatba bevont minták gyógyszerkönyvi minőségűek, hiszen a főkomponenseik százalékos értéke a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv által meghatározott referencia tartományba esik. A borsmenta illóolaj két főkomponenssel bír, a menton referencia tartománya 14,0-32,0%, a mentolé pedig 30,0-55,0%. Mind a menton (19,8%), mind pedig a mentol (50,4%) százalékos aránya megfelel az irodalmi értékeknek (Tisserand & Young, 2014). A fahéjfa kéreg illóolajának főkomponense, a *transz*-fahéjaldehid a referencia tartomány (55,0-75,0%) közepére esik, az általunk vizsgált illóolaj 64,7%-ban tartalmazta. A szegfűszeg illóolaja esetében az eugenol, mint főkomponens 75,0-88,0% tartomány közé került, hiszen 78,8%-ban detektáltuk a mintában. A  $\beta$ -kariofillén tartalom a referencia tartomány (5,0-14,0%) felső határán van (13,5%). A kakukkfű esetében a gyógyszerkönyvi minőségű illóolaj timol tartalma 36,0-55,0% érték közé esik. Az általunk vizsgált minta 39,8%-ban tartalmaz timolt, így megállapítottuk, hogy a kakukkfű illóolaja is gyógyszerkönyvi minőségűnek mondható (6. táblázat).

6. táblázat A vizsgálatba bevont illóolajok analitikai elemzése folyadékfázisból történő injektálás esetén (GC-MS)

Komponens	RI	Komponensek százalékos értéke GC-MS mérés esetén (%)			
		borsmenta	fahéjkéreg	kakukkfű	szegfűszeg
$\alpha$ -pinén	939	1,1	5,1	-	-
kamfén	951	-	-	2,0	-
$\beta$ -mircén	992	-	-	1,0	-
$\alpha$ -terpinén	1017	-	-	3,2	-
<i>p</i> -cimol	1026	-	1,9	19,2	-
limonén	1044	1,4	1,8	-	0,5
1,8-cineol	1046	5,5	2,8	4,6	-
$\gamma$ -terpinén	1060	-	-	6,7	-
linalool	1104	-	4,0	5,6	-
izopulegon	1150	1,0	-	-	-
menton	1156	19,8	-	-	-
izomenton	1159	7,0	-	-	-
mentol	1172	50,4	-	-	-
izomentol	1183	4,3	-	-	-
$\alpha$ -terpineol	1190	-	2,2	-	-
<i>transz</i> -fahéjaldehid	1266	-	64,7	-	-
borneol	1289	-	-	1,0	-
timol	1297	-	-	39,8	-
karvakrol	1300	-	-	5,9	-
izomentil-acetát	1305	5,5	-	-	-

eugenol	1373	-	4,6	-	78,8
β-kariofillén	1417	-	4,2	4,2	13,5
cinnamil-acetát	1446	-	9,4	-	-
α-humulén	1452	-	-	-	4,6
β-kadinén	1473	-	-	-	1,1
<b>Totál</b>		<b>98,1</b>	<b>99,7</b>	<b>93,2</b>	<b>98,5</b>

7. táblázat A vizsgálatba bevont illóolajok analitikai elemzése folyadékból történő injektálás esetén (GC-FID)

Komponens	RI	Komponensek százalékos értéke GC-FID mérés esetén (%)			
		borsmenta	fahéjkéreg	kakukkfű	szegfűszeg
α-pinén	939	1,1	0,7	-	-
kamfén	951	-	-	1,2	-
β-mircén	992	-	-	1,0	-
α-terpinén	1017	-	-	1,7	-
p-cimol	1026	-	1,1	18,3	-
limonén	1044	1,4	1,4	-	-
1,8-cineol	1046	5,5	1,7	3,6	-
γ-terpinén	1060	-	-	4,8	-
linalool	1104	-	3,9	5,7	-
izopulegon	1150	1,0	-	-	-
menton	1156	19,8	-	-	-
izomenton	1159	7,0	-	-	-
mentol	1172	50,4	-	-	-
izomentol	1183	4,3	-	-	-
α-terpineol	1190	-	1,3	-	-
transz-fahéjaldehid	1266	-	75,1	-	-
borneol	1289	-	-	-	-
timol	1297	-	-	50,8	-
karvakrol	1300	-	-	3,7	-
izomentil-acetát	1305	5,5	-	-	-
eugenol	1373	-	3,0	-	87,2
β-kariofillén	1417	-	2,3	2,9	8,6
cinnamil-acetát	1446	-	5,6	-	-
α-humulén	1452	-	-	-	2,5
<b>Totál</b>		<b>98,1</b>	<b>96,1</b>	<b>93,7</b>	<b>98,3</b>



## 4.2. Bioautográfias vizsgálatok eredményei

Annak érdekében, hogy alátámasszuk a borsmenta, a fahéjkéreg, a kakukkfű és a szegfűszeg illóolájának antibakteriális hatását, bioautográfias vizsgálatokat alkalmaztunk. Ez az *in vitro* mikrobiológiai módszer lehetőséget ad mind az összillóolaj, mind pedig az illóolaj komponenseinek antibakteriális hatásának detektálására. Az összillóolaj vizsgálatok során a biológiailag aktív minta feltisztulási zónát eredményez a szilika rétegen. A zóna átmérőjének mérésével következtethetünk az összillóolaj minták antibakteriális hatására. Negatív kontrollként oldószert alkalmaztunk (abszolút etanol), pozitív kontrollként antibiotikumot használtunk: *H. influenzae* és *H. parainfluenzae* esetén gentamicint, *Streptococcus* törzsek, valamint *P. aeruginosa* esetén amikacint (rétegre felvitt hatóanyag tartalom: 0,1 mg). Annak érdekében, hogy megfigyeljük az antibakteriális hatás koncentrációfüggését, két különböző töménységű oldattal dolgoztunk minden illóolaj esetében (hatóanyag tartalom: 0,1 mg, 0,2 mg). Mivel az illóolajok főkomponenseinek antibakteriális hatására is kíváncsiak voltunk, így a mentol, fahéjaldehid, a timol és az eugenol is felvitelre került (0,01 mg). A vizsgálatainkat tizenkét ismétléssel végeztük el, a gátlási zónák átmérőinek átlagát a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat Összillóolaj minták antibakteriális hatása direkt bioautográfias tesztrendszerben, a gátlási zónák mm-ben értendőek

Illóolaj minta koncentrációja	Baktériumtörzsek					
	<i>H. inf.</i>	<i>H. parainf.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. pneu.</i>	
borsmenta	0,1 mg	4,26 ± 0,6	2,99 ± 0,6	3,17 ± 0,5	4,12 ± 0,5	3,02 ± 0,7
	0,2 mg	5,07 ± 0,5	3,61 ± 0,9	4,71 ± 0,4	4,91 ± 0,4	4,25 ± 0,5
mentol		2,14 ± 0,9	1,03 ± 0,5	1,69 ± 0,2	2,07 ± 0,2	1,14 ± 0,4
fahéjkéreg	0,1 mg	9,55 ± 0,5	8,26 ± 0,7	7,43 ± 0,6	6,97 ± 0,7	6,13 ± 0,7
	0,2 mg	<b>10,98 ± 0,7</b>	9,06 ± 0,9	7,53 ± 0,8	6,01 ± 0,8	6,51 ± 0,5
fahéjaldehid		4,06 ± 0,7	4,92 ± 0,4	3,51 ± 0,4	3,07 ± 0,8	2,99 ± 0,8
kakukkfű	0,1 mg	4,6 ± 0,6	4,39 ± 0,5	7,73 ± 0,3	10,08 ± 0,9	9,49 ± 0,9
	0,2 mg	8,13 ± 0,4	4,95 ± 0,2	8,18 ± 0,9	<b>11,23 ± 0,7</b>	9,63 ± 0,7
timol		2,2 ± 0,6	2,1 ± 0,5	3,52 ± 0,8	5,36 ± 0,2	4,66 ± 0,9
szegfűszeg	0,1 mg	7,39 ± 0,9	4,26 ± 0,5	5,52 ± 0,5	8,71 ± 0,5	8,06 ± 0,3
	0,2 mg	8,4 ± 0,7	4,39 ± 0,7	6,36 ± 0,4	8,97 ± 0,8	9,37 ± 0,8
eugenol		3,51 ± 0,5	2,19 ± 0,6	2,58 ± 0,2	4,63 ± 0,9	4,15 ± 0,5
antibiotikum	0,1 mg	24,61 ± 0,9	24,55 ± 0,9	19,45 ± 0,8	21,22 ± 0,7	19,05 ± 0,9
absz. etanol		0	0	0	0	0

Jelmagyarázat: *H. inf.*: *Haemophilus influenzae*, *H. parainf.*: *Haemophilus parainfluenzae*, *P. aerug.*: *Pseudomonas aeruginosa*, *S. mutans*: *Streptococcus mutans*, *S. pneu.*: *Streptococcus pneumoniae*

Bioautográfiai vizsgálataink alapján elmondható, hogy az illóolajok közül a kakukkfű és a fahéjkéreg illóolaja eredményezte a legnagyobb gátlási zónákat, a borsmenta volt a legkevésbé effektív.

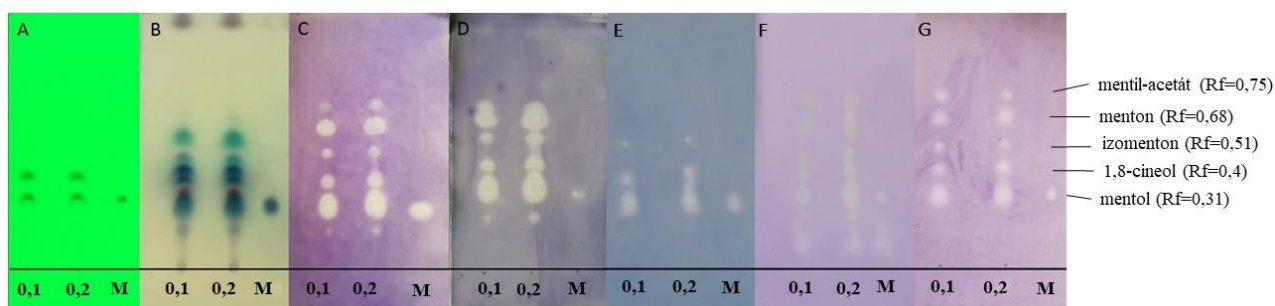
A borsmenta illóolajára legérzékenyebben a *H. influenzae* reagált, hiszen ennél a baktériumnál detektálhattuk a legnagyobb gátlási zónákat (0,1 mg: 4,3 mm, 0,2 mg: 5,1 mm). Ezt követte a *S. mutans*, amely szintén jelentősebb gátlást mutatott (0,1 mg: 4,2 mm, 0,2 mg: 4,9 mm). Jól ismert ennek a baktériumnak a fogak felszínén való megjelenése, így a fogak romlásáért is felelőssé tehető. Bizonyított tény, hogy a fogszuvasodás megelőzése érdekében alkalmazott szájöblögetők egy része tartalmaz pl. mentolt, így segítve a prevenciót (Bakkali, 2008). Eredményeink ezekkel a tényekkel egybeesnek, így ennek alapján elmondható, hogy a borsmenta illóolaja valóban eredményesen alkalmazható a *S. mutans* szaporodásának gátlásában, illetve a baktérium megjelenésének megelőzésében.

A szegfűszeg illóolaja hatásosságot tekintve követi a borsmenta aktivitását. A legnagyobb gátlási zónát a *S. pneumoniae* esetében észleltünk (0,1 mg: 8,7 mm, 0,2 mg: 9,37 mm), amelyet a *S. mutans* követ, így arra következtethetünk, hogy a *Streptococcus* fajok nagyobb érzékenységet mutatnak a szegfűszeg illóolajával szemben a *Haemophilus* törzsekhez és a *P. aeruginosa*hoz képest. Az általunk vizsgált baktériumtörzsek közül a *H. parainfluenzae* szaporodását gátolta legkevésbé a szegfűszeg illóolaja. A kakukkfű illóolaj esetében megfigyelhető, hogy az illóolajos kezelés valamennyi tesztbaktérium szaporodását gátolni tudta. A *S. mutans* volt a legérzékenyebb a kakukkfű illóolajjal szemben (0,1 mg: 10,1 mm, 0,2 mg: 11,2 mm), ezt követi a *S. pneumoniae* (0,1 mg: 9,5 mm, 0,2 mg: 9,6 mm). Hasonlóan a szegfűszeg illóolajához, megállapítható, hogy a *Streptococcus* fajok szaporodását kakukkfű illóolajjal eredményesebben lehet gátolni, összehasonlítva a *Haemophilus* törzsekkel. A két *Haemophilus* faj közül a *H. influenzae* bizonyult érzékenyebbnek.

Fontos megemlíteni, hogy a vizsgálatunkban résztvevő négy illóolaj közül, a *Haemophilus* fajok kivételével, mind a két *Streptococcus* és a *P. aeruginosa* is a kakukkfűvel szemben mutatta a legnagyobb gátló hatást. Negatív kontrollként abszolút etanolt alkalmaztunk, de egyik esetben sem eredményezett gátlási zónát. Így kijelenthető, hogy az illóolajok antibakteriális hatását az oldószer nem befolyásolta.

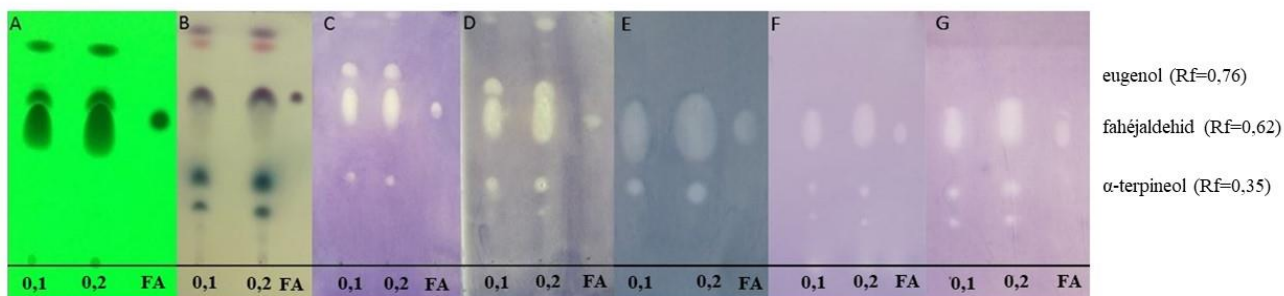
Összességében megállapítható, hogy az összillóolaj mintákkal elvégzett bioautográfiai eredményeink megfelelnek az irodalmi adatoknak. *Haemophilus* fajok esetében mi alkalmaztuk először ezt a módszert az illóolajok hatásosságának vizsgálata érdekében (Balázs et al., 2019). A négy illóolaj közül a kakukkfű és a fahéjkéreg volt a legaktívabb mikrobiológiai

szempontból. Annak érdekében, hogy megállapítsuk mely komponensek felelősek az illóolajok antibakteriális hatásáért, a réteglapok kifejlesztését is elvégeztük a bioautográfiás vizsgálatok során. Eredményeinket az 4-7. ábrák szemléltetik.



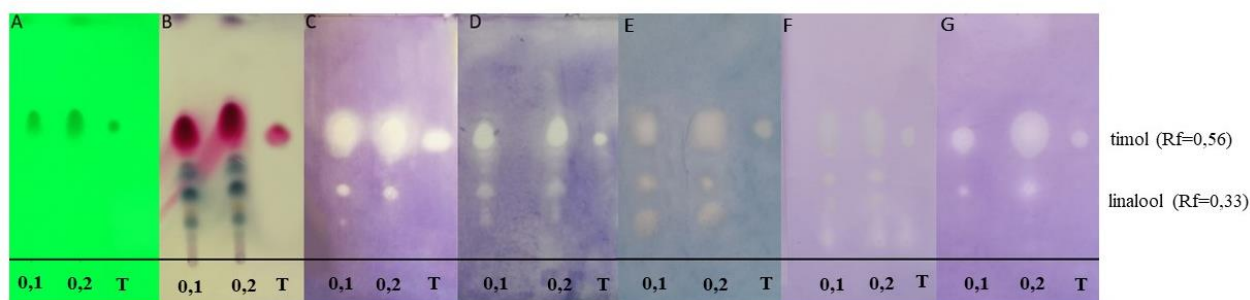
4. ábra A borsmenta illóolaj komponenseinek antibakteriális hatása

Jelmagyarázat: **A:** Detektálás UV fény alatt (254 nm), **B:** Detektálás vanillin-kénsav reagenssel, **C:** Bioautográfiás vizsgálat – *H. influenzae*, **D:** Bioautográfiás vizsgálat – *H. parainfluenzae*, **E:** Bioautográfiás vizsgálat – *P. aeruginosa*, **F:** Bioautográfiás vizsgálat – *S. mutans*, **G:** Bioautográfiás vizsgálat – *S. pneumoniae*. 0,1 és 0,2 jelölések: 0,1 és 0,2 mg illóolaj (0,5 és 1 µl rétegre felvitt mennyiségben). **M:** mentol 0,01 mg (borsmenta illóolaj főkomponense)



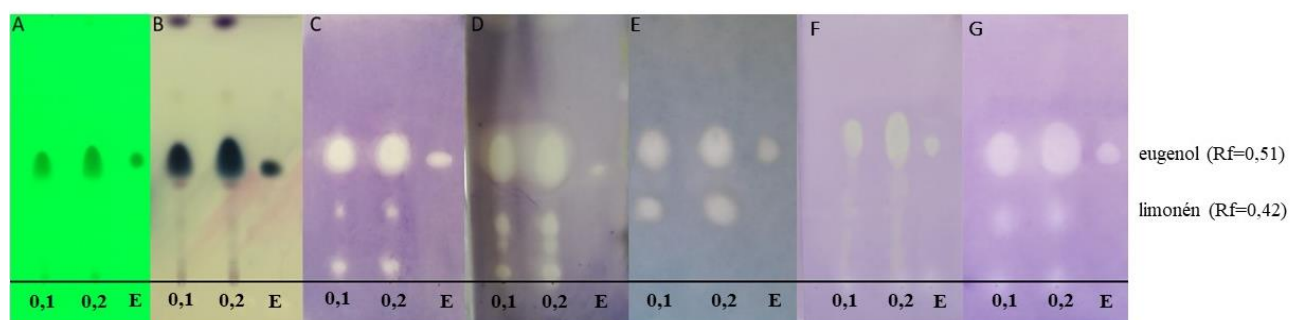
5. ábra A fahéjkéreg illóolaj komponenseinek antibakteriális hatása

Jelmagyarázat: **A:** Detektálás UV fény alatt (254 nm), **B:** Detektálás vanillin-kénsav reagenssel, **C:** Bioautográfiás vizsgálat – *H. influenzae*, **D:** Bioautográfiás vizsgálat – *H. parainfluenzae*, **E:** Bioautográfiás vizsgálat – *P. aeruginosa*, **F:** Bioautográfiás vizsgálat – *S. mutans*, **G:** Bioautográfiás vizsgálat – *S. pneumoniae*. 0,1 és 0,2 jelölések: 0,1 és 0,2 mg illóolaj (0,5 és 1 µl rétegre felvitt mennyiségben). **FA:** fahéjaldehid 0,01 mg (fahéjkéreg illóolaj főkomponense)



6. ábra A kakukkfű illóolaj komponenseinek antibakteriális hatása

Jelmagyarázat: **A:** Detektálás UV fény alatt (254 nm), **B:** Detektálás vanillin-kénsav reagenssel előhívva, **C:** Bioautográfiás vizsgálat – *H. influenzae*, **D:** Bioautográfiás vizsgálat – *H. parainfluenzae*, **E:** Bioautográfiás vizsgálat – *P. aeruginosa*, **F:** Bioautográfiás vizsgálat – *S. mutans*, **G:** Bioautográfiás vizsgálat – *S. pneumoniae*. 0,1 és 0,2 jelölések: 0,1 és 0,2 mg illóolaj (0,5 és 1 µl rétegre felvitt mennyiségben). **T:** timol 0,01 mg (kakukkfű illóolaj főkomponense)



7. ábra A szegfűszeg illóolaj komponenseinek antibakteriális hatása

Jelmagyarázat: **A:** Detektálás UV fény alatt (254 nm), **B:** Detektálás vanillin-kénsav reagenssel, **C:** Bioautográfiás vizsgálat – *H. influenzae*, **D:** Bioautográfiás vizsgálat – *H. parainfluenzae*, **E:** Bioautográfiás vizsgálat – *P. aeruginosa*, **F:** Bioautográfiás vizsgálat – *S. mutans*, **G:** Bioautográfiás vizsgálat – *S. pneumoniae*. 0,1 és 0,2 jelölések: 0,1 és 0,2 mg illóolaj (0,5 és 1 µl rétegre felvitt mennyiségben). **E:** eugenol 0,01 mg (szegfűszeg illóolaj főkomponense)

Az elvégzett bioautográfiás kísérletek alapján elmondható, hogy a *Haemophilus* fajok esetében több komponens volt aktív hatású, mint a *P. aeruginosa* és a *S. pneumoniae* esetén. A *S. mutans* reagált a legkevésbé érzékenyen a kezelésre, hiszen nem voltak egyértelműen tiszták a gátlási zónák. A főkomponensek a vizsgálatunkba bevont légúti patogének mindegyikével szemben gátlást okoztak. Azonban emellett megfigyelhető, hogy a legtöbb esetben nemcsak a

főkomponenseknek volt köszönhető az illóolajok aktivitása, hiszen a minor komponensek is eredményeztek gátlási zónát. A frakciók azonosítása GC-MS segítségével történt a Semmelweis Egyetem Farmakognóziái Intézetében, preparatív rétegekromatográfiás vizsgálat segítségével. A vizsgálat részletes eredményeit a melléklet 9.2. pontja foglalja össze.

Mindegyik baktériumtörzs esetében a **borsmenta** több komponense is gátló hatást eredményezett. Főkomponense mindegyik baktériumtörzset gátolta (mentol,  $R_f=0,31$ ). Emellett az 1,8-cineol ( $R_f=0,4$ ), az izomenton ( $R_f=0,51$ ), valamint a menton ( $R_f=0,68$ ) mutatott gátló hatást. A *Haemophilus* nemzetség tagjai reagáltak a legérzékenyebben, hiszen itt detektáltuk a legjobban kivethető gátlási zónákat. A *P. aeruginosa*-t a főkomponensen kívül kis mértékben az 1,8-cineol és az izomenton gátolta. A *S. mutans* esetében halványabb zónákat figyelhattunk meg, a legaktívabb komponensnek a mentol ( $R_f=0,31$ ) bizonyult. A *S. pneumoniae* szintén több komponens esetén eredményezett feltisztulási zónát (menton, 1,8-cineol, izomenton, menton, mentil-acetát).

A **fahéjkéreg** illóolajának komponensei közül a legaktívabb a fahéjaldehid ( $R_f=0,62$ ) volt, továbbá az  $\alpha$ -terpineol ( $R_f=0,35$ ) eredményezett kismértékű gátlást mindegyik baktériumtörzs esetén. Az eugenol ( $R_f=0,76$ ) hatása is megmutatkozott a *Haemophilus* fajoknál. A **kakukkfű** illóolajánál kifejezett gátlást a főkomponensnél (timol:  $R_f=0,56$ ) figyelhattunk meg, továbbá a linalool ( $R_f=0,33$ ) mutatott baktériumnövekedést gátló hatást. A **szegfűszeg** illóolaja esetén a legeredményesebb gátlást az eugenol ( $R_f=0,51$ ) eredményezte, de nem elhanyagolható a limonén hatása sem ( $R_f=0,42$ ), amely a *S. mutans* esetében mutatkozott meg a legkevésbé. Antibakteriális vizsgálataink összecsengenek az eddigi irodalmi adatokkal. Fabio és munkatársai korong diffúziós módszerrel alátámasztották, hogy a fahéjkéreg, a szegfűszeg és a kakukkfű illóolaja antibakteriális hatással rendelkezik *H. influenzae*, *S. pyogenes*, valamint *S. agalactiae* baktériumokkal szemben (Fabio et al., 2007). Iscan kutatócsoportja bioautográfiás módszert alkalmazva kimutatta, hogy a borsmenta illóolaja képes visszaszorítani a *P. aeruginosa* baktérium növekedését. (Iscan et al., 2002), továbbá Houdkova és munkatársai, és Inouye kutatócsoportja megerősítette a mentol és a menton *Haemophilus* fajokkal szembeni hatásosságát (Inouye et al., 2001; Houdkova et al., 2017). Horváth és munkatársai a kakukkfű és fahéjkéreg illóolajának aktivitását bioautográfiás vizsgálattal bizonyította *Pseudomonas* törzs képviselőivel szemben (Horváth et al., 2010). Móricz és munkatársai szintén Gram-negatív baktériumokkal dolgoztak, bioautográfiás tesztrendszer optimalizálva, azonban kizárólag a gilisztaűző varádics illóolaj aktivitására voltak kíváncsiak (Móricz et al., 2015). A fahéjkéreg, és a kakukkfű illóolajának hatékonyságát igazolták bioautográfiás rendszerben *B. subtilis* és *E. coli* mellett *P. aeruginosa* (Choma &

Grzelak, 2011) baktériumokkal szemben (Behravan et al., 2007; Jesionek et al., 2017), amely megerősítette, hogy a timol és a fahéjaldehid is hatásosnak mondható felső légúti megbetegedések kezelésében (Pérez-Rosés et al. 2016; Schönknecht et al. 2016; Kissels et al. 2017; Oliviero et al. 2016). Az eddigi irodalmi adatok alapján megállapítottuk, hogy munkánk újdonsága az, hogy elsőként optimalizáltuk a bioautográfiás rendszert légúti patogénekre, amelyek közül a *Haemophilus* spp. tagjai külön kiemelendők, hiszen különleges tápanyagigényű baktériumok csoportját képviselik. Továbbá elsőként detektáltuk a borsmenta, és főkomponense, a mentol antibakteriális hatását ebben a tesztrendszerben légúti patogénekekkel szemben. Munkánk összefoglaló képet ad a leggyakrabban alkalmazott illóolajok és főkomponenseik gátló hatásáról, a legjelentősebb légúti baktériumokra kifejtett gátló hatásuk bebizonyításával. A legtöbb tanulmány az illóolajok főkomponensének tulajdonítja baktériumellenes hatását, azonban vizsgálataink alátámasztották, hogy a minor komponensek is fontos szerepet játszanak az antibakteriális hatás kifejtésében (Balázs et al., 2019).

#### **4.3. MIC értékek meghatározásának eredményei**

Mivel a biofilm vizsgálatok során a minimális gátló koncentráció felével (MIC/2) dolgoztunk, ezért szükség volt az általunk vizsgált minták MIC értékének meghatározására. Minimális gátló koncentrációként határoztuk meg az illóolaj azon legkisebb koncentrációját, amely az inkubációs idő letelte után (24 óra), a kontrollhoz viszonyítva >90%-ban képes volt a baktérium szaporodását gátolni. A MIC meghatározás eredményeit az 9. táblázat foglalja össze. Eredményeinkből megállapítottuk, hogy a *Haemophilus* fajok között nem detektáltunk számottevő különbséget. Mind a *H. influenzae*, mind pedig a *H. parainfluenzae* a fahéjkéreg illóolajára reagált a legérzékenyebben (MIC: 0,06-0,08 mg/ml). A pozitív kontrollként alkalmazott antibiotikumok hatékonyabbnak bizonyultak az illóolaj mintákkal összehasonlítva.

9. táblázat A vizsgált illóolajok és antibiotikumok MIC értékei (illóolajok esetén: mg/ml; antibiotikumok esetén: µg/ml)

Illóolaj minták	Baktériumtörzsek				
	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. pneumoniae</i>
borsmenta	0,21	0,21	1,5	1,96	0,35
fahéjkéreg	0,06	0,06	0,4	0,78	0,06
kakukkfű	0,11	0,11	1,4	0,46	0,12
szegfűszeg	0,25	0,25	1,6	1,02	0,25
amikacin	0,8	0,8	-	-	-
gentamicin	-	-	2	-	-
amoxicillin	-	-	-	0,3	-
imipenem	-	-	-	-	0,4

A MIC meghatározás eredményei összecsengenek korábbi vizsgálatok eredményeivel. Ács és munkatársai csőhígítás módszerével állapították meg a fent említett illóolajok minimális gátló koncentrációját légúti baktériumokkal szemben. Vizsgálataik alátámasztották, hogy a két Streptococcus faj közül a *S. pneumoniae* reagált érzékenyebben az illóolajok jelenlétére. Mindkét baktérium a kakukkfű és a fahéjkéreg illóolajára volt érzékeny (Ács et al., 2018). A *Haemophilus* fajoknál sem elhanyagolható a kakukkfű és a fahéjkéreg illóolajának hatása, amelyet több tanulmány is alátámaszt (Choi et al., 2016; Ács et al., 2018). Szintén csőhígítás módszerét alkalmazva határozták meg *P. aeruginosa* baktériummal szemben a fahéjkéreg illóolaj gátló hatását (0,5 mg/ml: Clemente et al., 2016; 0,3 mg/ml: Purkait et al., 2020), amely összecseng az általunk mért adatokkal. A kakukkfű hatását Boskovic és munkatársai, Golkar és Pesavento kutatócsoportja vizsgálta, azonban kizárólag élelmiszerek romlását okozó baktériumokkal (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp.) szemben (Boskovic et al., 2015; Pesavento et al., 2015; Golkar et al., 2020). Ez is bizonyítja, hogy a timolos kemotípusú kakukkfű illóolaj légúti patogénekkal szembeni tesztelésének újdonság erejét, és fontosságát. A szegfűszeg illóolaj MIC meghatározásával több kutatócsoport is foglalkozott az utóbbi években (Tu et al., 2018; Imane et al., 2020), ám légúti kórokozókkal szembeni vizsgálatuk néhány tanulmányra korlátozódik. Fabio és munkatársai *H. influenzae* és *S. pneumoniae* esetében is 0,0125 ml/ml MIC értéket detektált (Fabio et al., 2007).

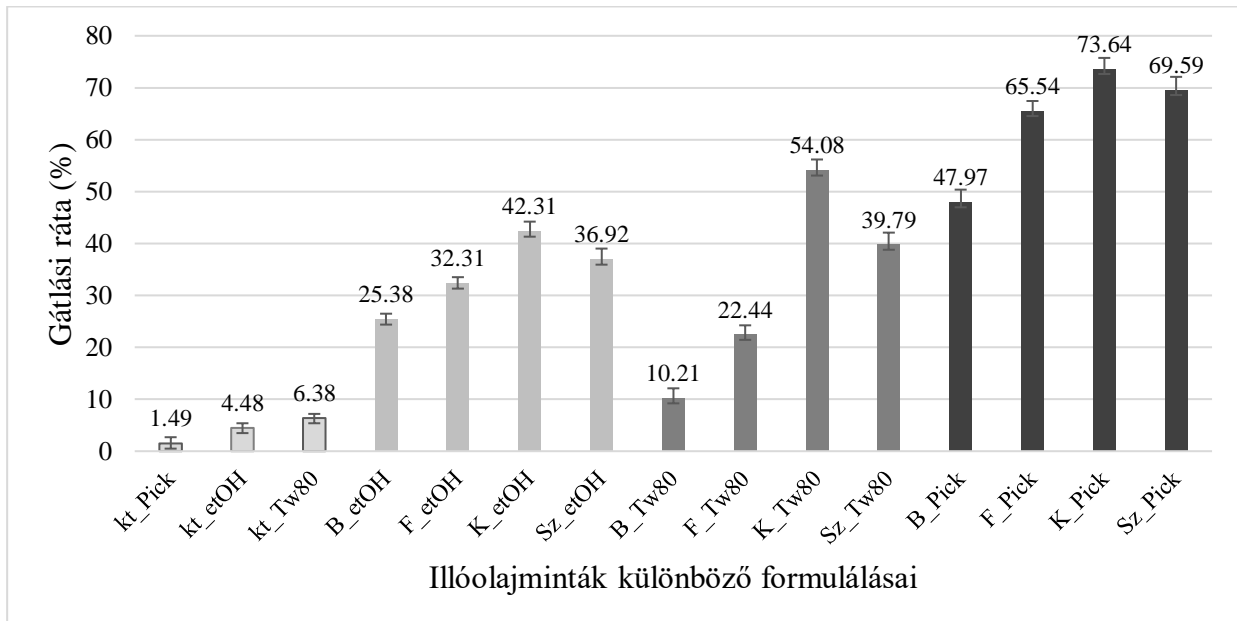
#### 4.4. Az illóolajok biofilm gátló hatásának eredményei

Kutatásaink során célul tűztük ki a borsmenta, a fahéjkéreg, a kakukkfű és a szegfűszeg illóolajok biofilm-képződésre kifejtett hatásának vizsgálatát is. Mivel az illóolajok lipofil karakterűek, biohasznosulásuk javítása érdekében elvégeztük az illóolajok nanotechnológiai formulálását Pickering emulziót készítve. A vizsgálat során célunk volt, hogy megfigyeljük az illóolaj törzsoldatok készítésénél leggyakrabban használt oldószer (abszolút etanol), valamint emulgens (Tween80) hatását is biofilm-gátlást vizsgáló rendszerben. Az abszolút etanol, a Tween80 és a Pickering emulzió önmagában, azaz illóolaj nélkül kifejtett hatását is néztük. Az eredményeinket a kontrolltól való eltérés formájában szemléltetjük gátlási ráta százalékos arányának megjelölésével (Yanwei et al., 2018). Minden baktérium esetén a Pickering emulzió eredményezte a legkisebb mértékű kontrolltól (kezeletlen baktérium) való eltérést (1,35-1,81%) (8-12. ábrák). Az abszolút etanol sem eredményezett önmagában jelentős gátló hatást (3,12-4,52%), azonban a Tween80 emulgens gátló hatása bizonyult a legerősebbnek a három kontroll közül (6,35-11,8%). Ezzel szemben nem a Tween80 emulgenssel előállított illóolaj minták eredményezték a legefektívebb gátlást, hanem a nanotechnológiailag formulált minták (8-12. ábrák). Vizsgálataink alátámasztották, hogy mind a négy illóolaj rendelkezik biofilm-gátló hatással a vizsgálatba bevont baktériumtörzsek esetén. Megállapítottuk, hogy a nanotechnológiailag formulált illóolaj sokkal hatékonyabban képes kifejtetni hatását az alkohollal illetve Tween80 emulgenssel formulált törzsoldatokkal szemben.

A *H. influenzae* esetében a leghatásosabb illóolajnak a kakukkfű (73,64%) bizonyult, amelyet a szegfűszeg (69,59%) követ. Mindkét illóolaj esetében a nanotechnológiailag formulált minták eredményezték a legintenzívebb gátló hatást (etanolos kivonat kakukkfű esetén: 42,31%; Tween80-nal emulgeált kivonat kakukkfű esetén: 54,08%; etanolos kivonat szegfűszeg esetén: 36,92%; Tween80-nal emulgeált kivonat szegfűszeg esetén: 39,79%). A kakukkfű illóolajának hatékonyságát nagymértékben befolyásolták a különböző formulálási technikák. Megfigyelhető, hogy az etanolos kivonathoz képest másfélszeres gátló hatás növekedést eredményezett a nanotechnológiailag formulált kakukkfű illóolaj. Az esetek többségében az a tendencia figyelhető meg, hogy a legkisebb gátló hatást az etanolos kivonatok eredményezték, amelyet a Tween80-al emulgeált minták követték, legjobb hatást pedig az illóolajos Pickering-emulziók eredményezték. Kivételt a borsmenta illóolaja képez, hiszen az abszolút etanolban oldott borsmenta illóolaja nagyobb gátlást eredményezett (25,38%), mint a Tween80 emulgenssel oldott olaj (10,21%). Összességében eredményeink azt mutatják, hogy a *H.*



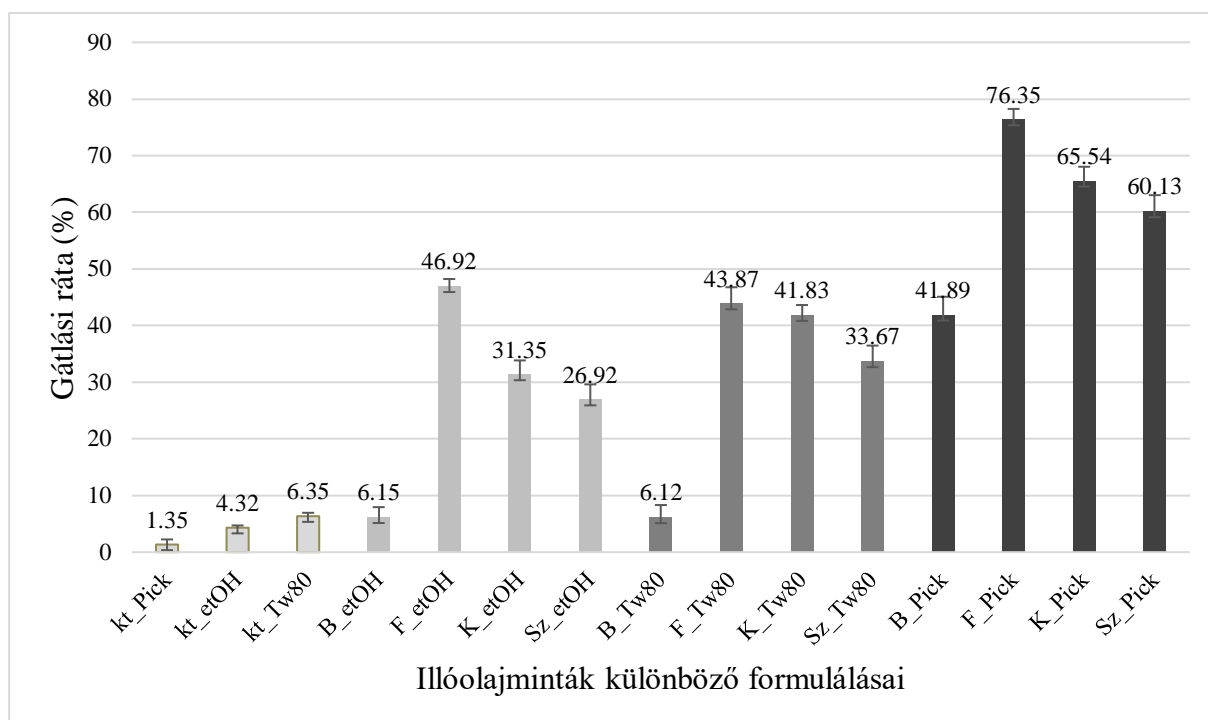
*influenzae* baktériummal szemben mind a négy illóolaj hatásosnak bizonyult, leginkább hatásosnak a nanotechnológiailag formulált minták tekinthetők (8. ábra).



8. ábra Illóolajok *H. influenzae* biofilm gátló hatása különböző formulálások esetén

Jelmagyarázat: kt\_Pick: Pickering-emulzió kontroll, kt\_etOH: abszolút etanolos kontroll, kt\_Tw80: Tween80 kontroll, B\_etOH: Borsmenta etanolos oldat, F\_etOH: Fahéjkéreg etanolos oldat, K\_etOH: Kakukkfű etanolos oldat, Sz\_etOH: Szegfűszeg etanolos oldat, B\_Tw80: Borsmenta Tween80-as emulzió, F\_Tw80: Fahéjkéreg Tween80-as emulzió, K\_Tw80: Kakukkfű Tween80-as emulzió, Sz\_Tw80: Szegfűszeg Tween80-as emulzió, B\_Pick: Borsmenta Pickering-emulzió, F\_Pick: Fahéjkéreg Pickering-emulzió Sz\_Pick: Szegfűszeg Pickering-emulzió K\_Pick: Kakukkfű Pickering-emulzió

A *H. parainfluenzae* esetében hasonló összefüggéseket figyeltünk meg, hiszen a nanotechnológiailag formulált illóolajok kiemelkedően aktívnak bizonyultak. A *H. parainfluenzae* esetében (ellentétben a *H. influenzae* baktériummal) a fahéjkéreg fejtette ki a legjelentősebb gátló hatást (etanolos oldat: 46,92%, Tween80 emulgessel készült emulzió: 43,87%, fahéjkéreg illóolaj tartalmú Pickering-emulzió: 76,35%). A nanotechnológiailag formulált kakukkfű és a szegfűszeg illóolajának hatása sem elhanyagolható, hiszen 60-65%-os eltérést eredményeztek a kontroll biofilmképződéshez képest (9. ábra).

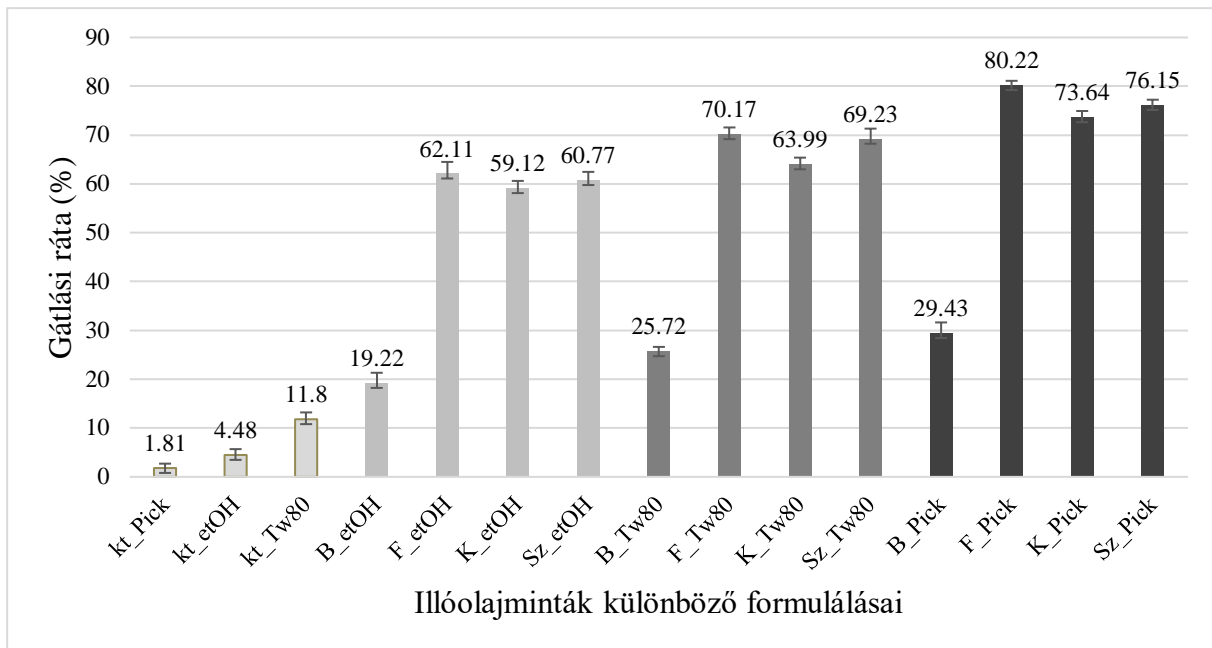


9. ábra Illóolajok *H. parainfluenzae* biofilm gátló hatása különböző formulálások esetén

Jelmagyarázat: kt\_Pick: Pickering-emulzió kontroll, kt\_etOH: abszolút etanolos kontroll, kt\_Tw80: Tween80 kontroll, B\_etOH: Borsmenta etanolos oldat, F\_etOH: Fahéjkéreg etanolos oldat, K\_etOH: Kakukkfű etanolos oldat, Sz\_etOH: Szegfűszeg etanolos oldat, B\_Tw80: Borsmenta Tween80-as emulzió, F\_Tw80: Fahéjkéreg Tween80-as emulzió, K\_Tw80: Kakukkfű Tween80-as emulzió, Sz\_Tw80: Szegfűszeg Tween80-as emulzió, B\_Pick: Borsmenta Pickering-emulzió, F\_Pick: Fahéjkéreg Pickering-emulzió Sz\_Pick: Szegfűszeg Pickering-emulzió K\_Pick: Kakukkfű Pickering-emulzió

A *P. aeruginosa* baktériumnál megfigyelhető, hogy a fahéjkéreg mutatta a legjelentősebb biofilm gátló hatást. Az abszolút etanolos oldattal történt kezelés során a fahéjkéreg illóolaja 62,11%-os gátlást eredményezett a kontrollhoz képest. A Tween80 emulgens alkalmazásakor ez az érték majdnem 10%-al emelkedett (70,17%), ami a Tween80 hatásának tulajdonítható, a fahéjkéreg illóolaj tartalmú Pickering-emulzió pedig 80,22%-os biofilm képződést gátló hatást eredményezett. Ebben az esetben is látható a Pickering-emulzió hatásossága a Tween80-as emulzió és az abszolút etanolos oldattal szemben. A borsmenta illóolaja eredményezte a legkisebb aktivitást mindhárom formulálás esetén (etanolos oldat: 19,22%, Tween80 emulgens alkalmazása esetén: 25,72%, borsmenta illóolajat tartalmazó Pickering-emulzió: 29,43%). Érdemes kiemelni, hogy a *P. aeruginosa* baktérium reagált a legérzékenyebben a kizárólag

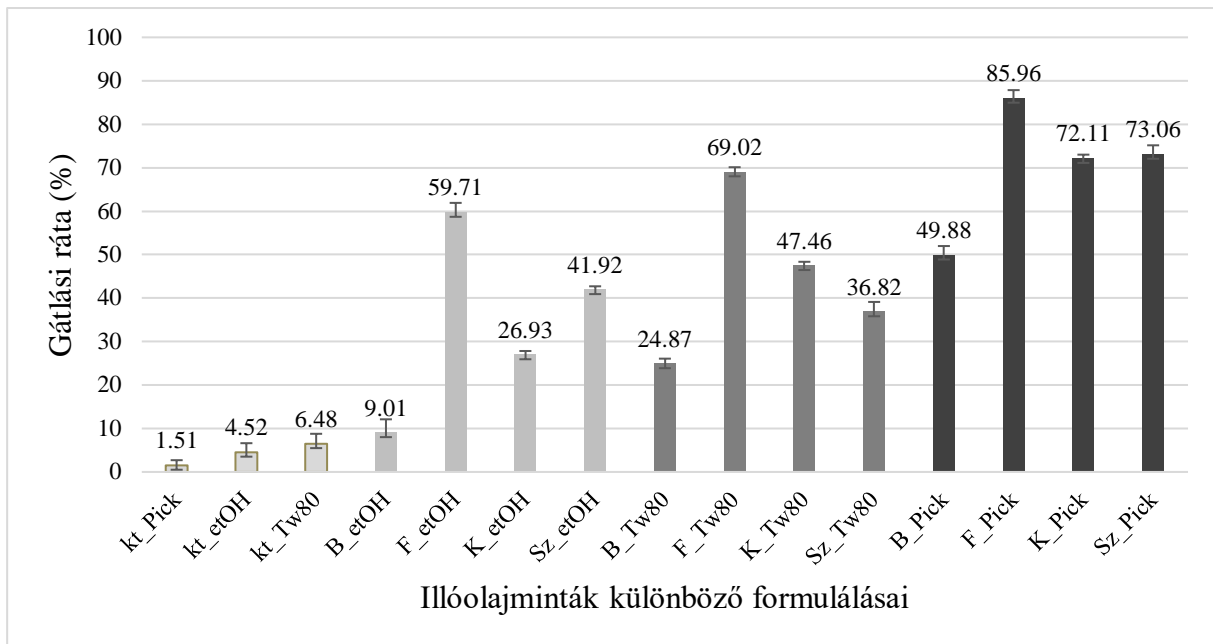
Tween80-t tartalmazó kezelésre, hiszen 11,8%-os gátlást eredményezett, ezen szemben a kontroll Pickering-emulzió mindössze 1,81%-os gátló hatást fejtett ki (10. ábra).



10. ábra Illóolajok *P. aeruginosa* biofilm gátló hatása különböző formulálások esetén

Jelmagyarázat: kt\_Pick: Pickering-emulzió kontroll, kt\_etOH: abszolút etanolos kontroll, kt\_Tw80: Tween80 kontroll, B\_etOH: Borsmenta etanolos oldat, F\_etOH: Fahéjkéreg etanolos oldat, K\_etOH: Kakukkfű etanolos oldat, Sz\_etOH: Szegfűszeg etanolos oldat, B\_Tw80: Borsmenta Tween80-as emulzió, F\_Tw80: Fahéjkéreg Tween80-as emulzió, K\_Tw80: Kakukkfű Tween80-as emulzió, Sz\_Tw80: Szegfűszeg Tween80-as emulzió, B\_Pick: Borsmenta Pickering-emulzió, F\_Pick: Fahéjkéreg Pickering-emulzió Sz\_Pick: Szegfűszeg Pickering-emulzió K\_Pick: Kakukkfű Pickering-emulzió

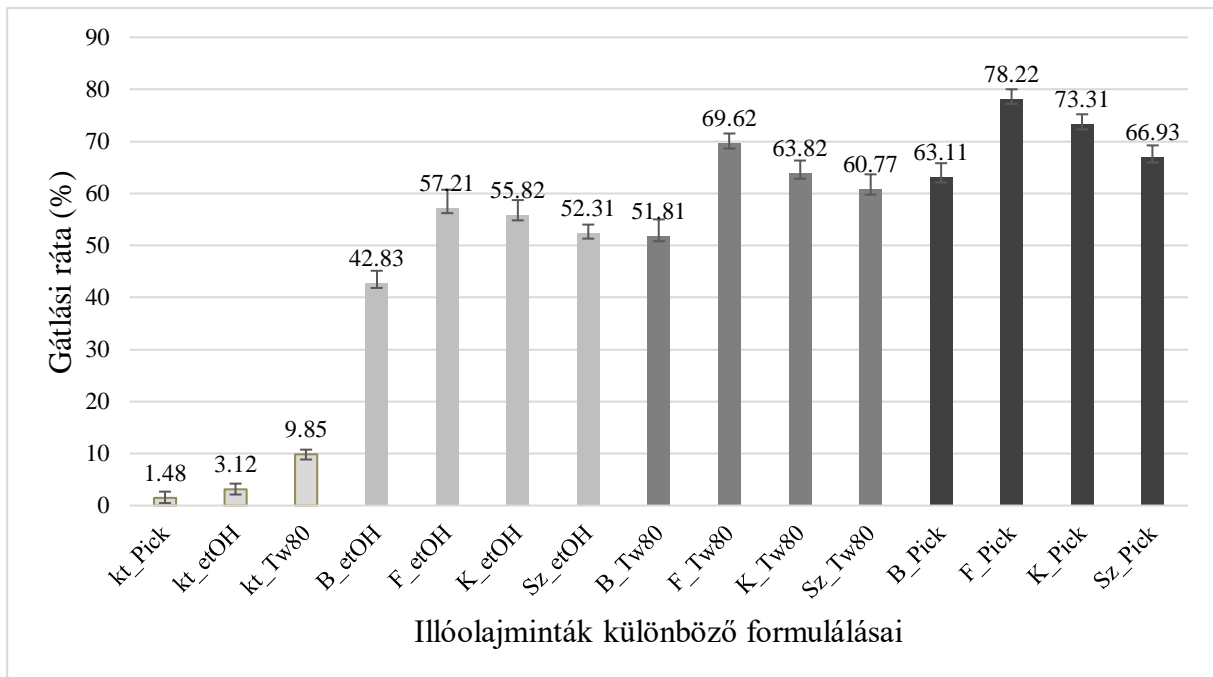
A *S. mutans* esetében szintén a leghatékonyabbnak a fahéjkéreg illóolaja (85,96%) bizonyult, viszont számottevő gátló hatást detektáltunk a szegfűszeg illóolájának esetében is (73,06%). A borsmenta volt a legkevésbé hatékony (49,88%). Eredményeink összecsengenek a bioautográfiás vizsgálat során tapasztaltakkal: A *S. mutans* volt a fahéjkéreg illóolajra a legérzékenyebb a vizsgálatunkban szereplő négy illóolaj közül. Ebben az esetben is megfigyelhető, hogy a nanotechnológiailag formulált illóolajok eredményezték a legintenzívebb aktivitást (11. ábra) (Horváth et al., 2019).



11. ábra Illóolajok *S. mutans* biofilm degradációs hatása különböző formulálások esetén

Jelmagyarázat: kt\_Pick: Pickering-emulzió kontroll, kt\_etOH: abszolút etanos kontroll, kt\_Tw80: Tween80 kontroll, B\_etOH: Borsmenta etanos oldat, F\_etOH: Fahéjkéreg etanos oldat, K\_etOH: Kakukkfű etanos oldat, Sz\_etOH: Szegfűszeg etanos oldat, B\_Tw80: Borsmenta Tween80-as emulzió, F\_Tw80: Fahéjkéreg Tween80-as emulzió, K\_Tw80: Kakukkfű Tween80-as emulzió, Sz\_Tw80: Szegfűszeg Tween80-as emulzió, B\_Pick: Borsmenta Pickering-emulzió, F\_Pick: Fahéjkéreg Pickering-emulzió Sz\_Pick: Szegfűszeg Pickering-emulzió K\_Pick: Kakukkfű Pickering-emulzió

A *S. pneumoniae* esetén szintén a fahéjkéreg illóolaja volt képes a leghatékonyabban gátolni a biofilmképződést (gátlási ráta etanos oldat: 57,21%, Tween80 emulgens alkalmazásával előállított emulzió: 69,62%, Pickering-emulzió: 78,22%), de a kakukkfű illóolajának hatása sem elhanyagolható (Pickering-emulzió: 73,31). A *S. pneumoniae* esetében megfigyelhető, hogy a többi baktériumhoz képest, sokkal érzékenyebben reagált a borsmenta illóolajával történő kezelésre (42,83-63,11%). A fahéjkéreg illóolaját sorban a kakukkfű és a szegfűszeg illóolaja követte. A kakukkfű 73,31%-os gátlást eredményezett a kontrolljához viszonyítva, a szegfűszeg 66,93%-ot ért el. Minden illóolaj esetében a nanotechnológiailag formulált volt a leginkább hatásos (12. ábra).



12. ábra Illóolajok *S. pneumoniae* biofilm gátló hatása különböző formulálások esetén

Jelmagyarázat: kt\_Pick: Pickering-emulzió kontroll, kt\_etOH: abszolút etanos kontroll, kt\_Tw80: Tween80 kontroll, B\_etOH: Borsmenta etanos oldat, F\_etOH: Fahéjkéreg etanos oldat, K\_etOH: Kakukkfű etanos oldat, Sz\_etOH: Szegfűszeg etanos oldat, B\_Tw80: Borsmenta Tween80-as emulzió, F\_Tw80: Fahéjkéreg Tween80-as emulzió, K\_Tw80: Kakukkfű Tween80-as emulzió, Sz\_Tw80: Szegfűszeg Tween80-as emulzió, B\_Pick: Borsmenta Pickering-emulzió, F\_Pick: Fahéjkéreg Pickering-emulzió Sz\_Pick: Szegfűszeg Pickering-emulzió K\_Pick: Kakukkfű Pickering-emulzió

A biofilm gátló vizsgálat során az oldószereknél megfigyelhető, hogy míg a Tween80 önmagában is eredményez gátló hatást a táptalajos kontrollhoz képest, addig a Pickering-emulzió, valamint az abszolút etanol hatása elhanyagolható. A Tween80 segítségével készült illóolaj-emulziók esetében számottevő gátló hatást figyelhetünk meg, ez esetben az emulgens antibakteriális hatása nem kizárható. Ezt korábbi vizsgálat is leírta más *in vitro* módszerek esetén (Hood et al., 2003). A Pickering-emulzió alkalmazása ígéretesnek bizonyul illóolajok formulálására, hiszen a legnagyobb biofilm gátló hatással jellemezhető, önmagában (illóolaj nélkül) viszont nem fejt ki gátló hatást. Összességében elmondható, hogy az általunk vizsgált négy illóolaj közül a leghatásosabbnak a fahéjkéreg és a kakukkfű bizonyultak, ezt a megfigyelésünket a bioautográfiás vizsgálatok is alátámasztották. Továbbá kiemelendő, hogy az illóolajok nanotechnológiai formulálása hozzásegíti őket ahhoz, hogy hatékonyabban

kifejtsék biofilmre gyakorolt hatásukat. Ilyen formában feltételezhető a jobb biohasznosulásuk is, amely tulajdonságot további vizsgálatokban szükséges bizonyítani.

Eredményeink egy részét más kutatócsoportok is alátámasztották. A fahéjkéreg illóolaja meglehetősen népszerű, széles körben elterjedt az alkalmazása, és a jelentős antibakteriális hatásának köszönhetően feltételezhető volt a biofilm képződést gátló hatása is. Vizsgálatok irányultak a fahéjkéreg illóolajának *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter* sp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* és *S. aureus* baktériumok biofilmjének gátlására (Trombetta et al., 2005; Gupta et al., 2008; Hafedh et al., 2010; Zhang et al., 2016). A vizsgálatokban a fahéjkéreg illóolaj hatékonynak bizonyult, ám kifejezetten légúti megbetegedéseket okozó patogénekkal szembeni kutatások eddig nem álltak rendelkezésünkre. Elsőként detektáltuk a fahéjkéreg biofilmre kifejtett hatását *Haemophilus* spp. képviselőivel szemben (Balázs et al., 2019). A kakukkfű és a szegfűszeg illóolajának aktivitását *S. aureus*, *Brochothrix* sp., *Lactobacillus rhamnosus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *L. innocua*, valamint *C. jejuni*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. enteritidis*, *Streptococcus* sp. baktériumok biofilm képződése esetén vizsgálták (Rasooli et al., 2006; Liu et al., 2017; Jafri et al., 2021).

Kutatásunk során sikeresen igazoltuk a borsmenta, a fahéjkéreg, a kakukkfű és a szegfűszeg illóolajok biofilm degradációs hatását *Haemophilus* spp. (Balázs et al., 2019), *S. pneumoniae* és *S. mutans* (Horváth et al., 2019), valamint *P. aeruginosa* baktériumok esetén.

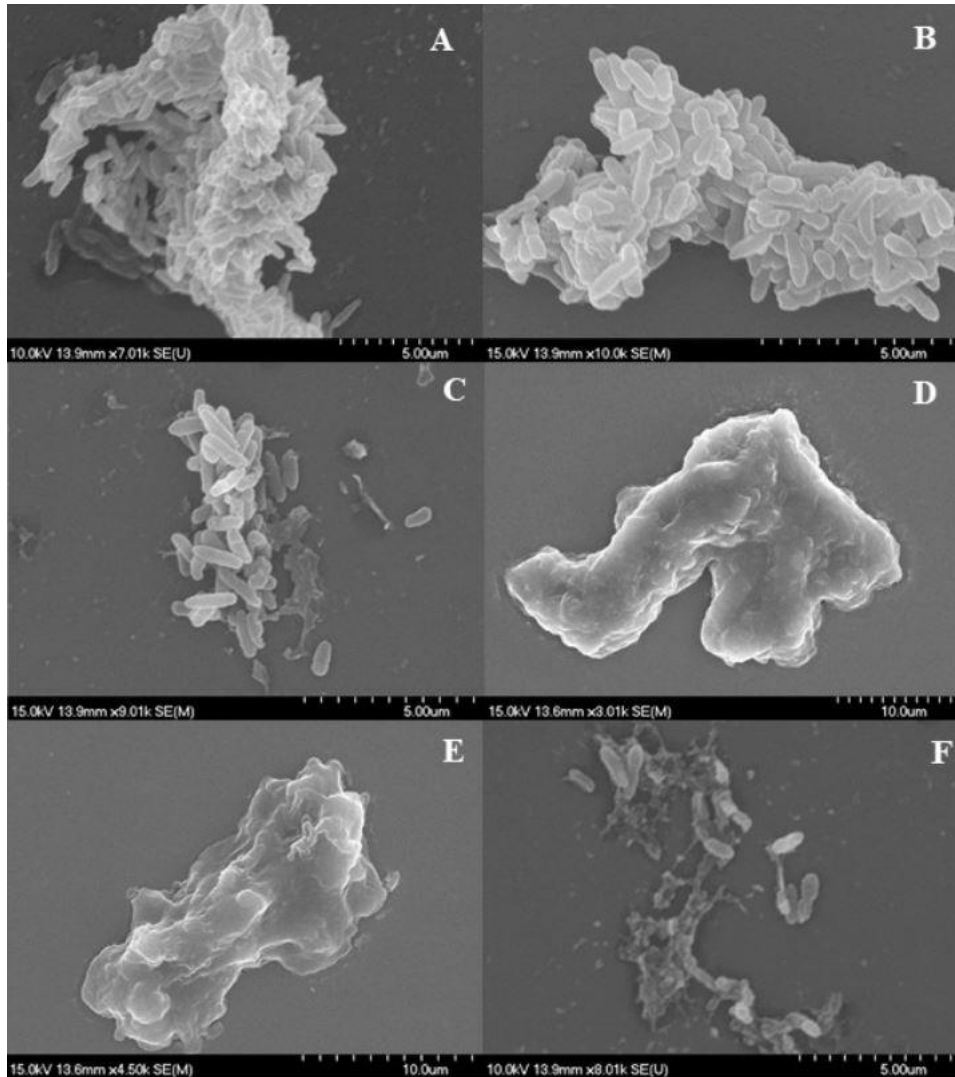
#### 4.5. A SEM vizsgálat eredményei

Scanning elektromikroszkópos (SEM) felvételeket *P. aeruginosa*, valamint *S. mutans* esetében nyílt lehetőségünk készíteni. A SEM felvételekkel sikerült szemléltetni az illóolajok biofilmre kifejtett hatását. A választásunk azért esett a fent említett két baktériumra, mert így mind Gram-negatív, mind pedig Gram-pozitív baktérium által képzett biofilm vizsgálatába is betekintést nyerhettünk. Mindemellett a *P. aeruginosa* a leginkább kutatott baktérium biofilm képződése miatt, hiszen a legtöbb légúti megbetegedés esetén a *P. aeruginosa* önálló, vagy más baktériumokkal kevert biofilmet alkotva eredményezi a krónikus légúti megbetegedéseket (Gergely, 2003; Høiby et al., 2010). A *S. mutans* gyakran a szájüregben, a fogak felszínén képez biofilmet, ezzel bázist adva más baktériumok megtelepedésének.

A *P. aeruginosa* esetében az első két ábrán (13. A és B) jól látható a háromdimenziós biofilm struktúra. A C ábrán a borsmenta illóolajával történő kezelés eredménye látható. Mivel az

általunk vizsgált illóolajok közül a borsmenta eredményezte a legkisebb biofilm képződést gátló hatást, így nem meglepő, hogy ezen a fotón ép baktériumsejteket láthatunk, amelyek viszont már összetapadni nem voltak olyan mértékben képesek, mint ahogyan a kezeletlen kontroll esetén megfigyelhető. A D ábrán a fahéjkéreg illóolajával történő kezelés eredménye figyelhető meg. A baktériumok sejt szerkezete teljesen deformálódott, feltételezhető, hogy funkcionálisan inaktívak. A *P. aeruginosa* esetében a fahéjkéreg illóolaját követve a leginkább aktív olajnak a szegfűszeget említhetjük. Az E ábrán extracelluláris mátrixot figyelhetünk meg. Az F ábra a kakukkfűvel történő kezelést szemlélteti. A borsmenta után a kakukkfű bizonyult a legkevésbé effektívnek, amelyet az F ábra is mutat. Ugyan biofilm képződés nem valósult meg, ezzel szemben megfelelő struktúrával rendelkező sejt figyelhető meg az alginát nyák körül (13. F ábra).

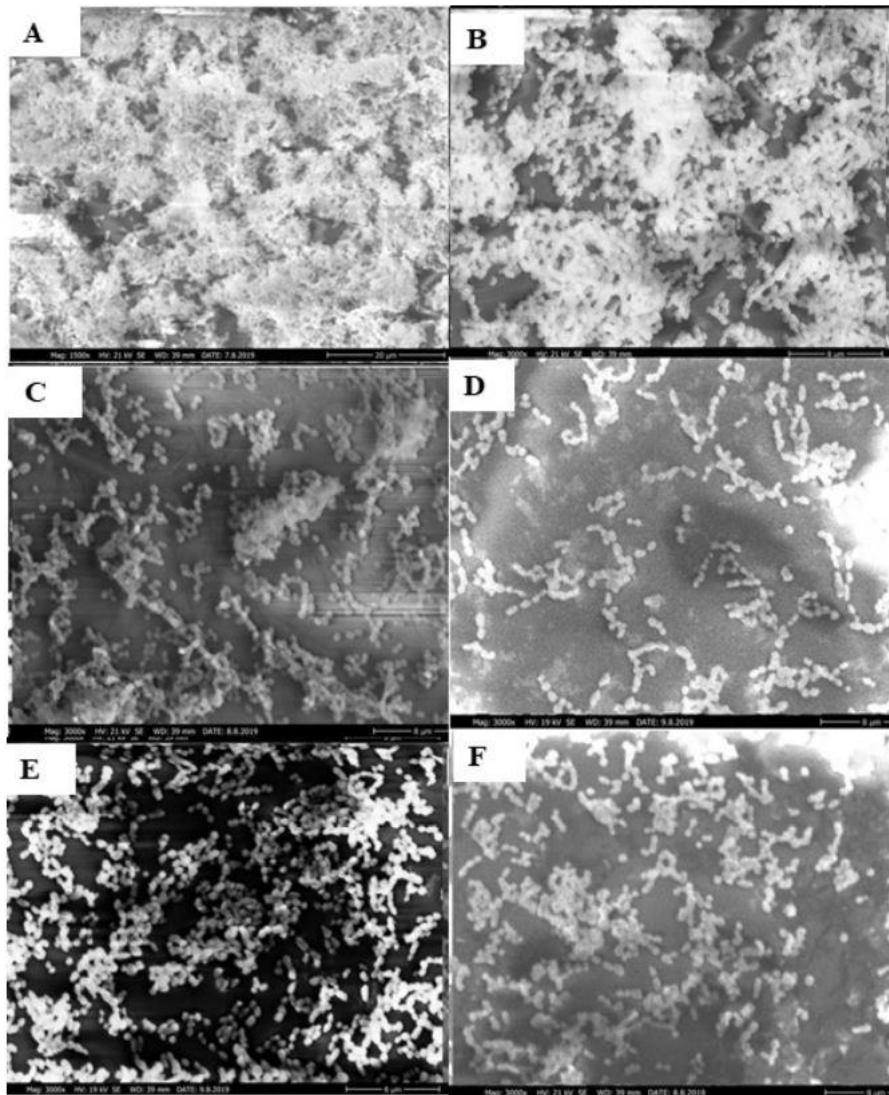
A *S. mutans* fotóit a 13. ábra mutatja be. Hasonlóan a *P. aeruginosa* baktériumhoz, az A és B ábrák a kezeletlen kontroll mintákat szemléltetik. A C ábra borsmentával történő kezelés utáni állapotot mutatja be. Ezzel az illóolajjal szemben mutatott a baktériumtörzs a legintenzívebb ellenállást, így megfigyelhető, hogy egy kisebb *S. mutans* biofilm is felépült. A fahéjkéreg illóolajának kezelése (D) következtében lecsökkent a sejtek száma, a szegfűszeg (E) és a kakukkfű illóolaja (F) szintén gátolni tudta a biofilm kialakulását (14. ábra). A sejtek letapadtak és mikrokolóniák is képződtek, de nincs összefüggő, háromdimenziós biofilm.



13. ábra A *P. aeruginosa* biofilm scanning elektronmikroszkópos képe különböző illóolajokkal történő kezelés hatására.

Jelmagyarázat: A, B: kontroll *P. aeruginosa* biofilm, C: borsmenta illóolajával kezelt minta, D: fahéjkéreg illóolajával kezelt minta, E: szegfűszeg illóolajával kezelt minta, F: kakukkfű illóolajával kezelt minta





14. ábra A *S. mutans* biofilm scanning elektronmikroszkópos képe különböző illóolajokkal történő kezelés hatására.

Jelmagyarázat: A, B: kontroll *S. mutans* biofilm, C: borsmenta illóolajával kezelt minta, D: fahéjkéreg illóolajával kezelt minta, E: szegfűszeg illóolajával kezelt minta, F: kakukkfű illóolajával kezelt minta

#### 4.6. A QS mechanizmus vizsgálatának eredményei

A *Chromobacterium violaceum* WT85 baktériumtörzs, egy indikátortörzs, amely a vizsgálati anyag quorum sensing (QS) gátló hatását depigmentáltság révén mutatja meg. A depigmentáltság okozta színtelen zónákat mértük (mm), ugyanis a baktérium színanyag termelése QS szabályozás alatt áll. Mind a négy illóolaj és főkomponenseik esetében hat párhuzamos mérést végeztünk el. Kontrollként abszolút etanolt alkalmaztunk. A gátlási zónák méretét (mm) az 10. táblázat foglalja össze.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a vizsgált illóolajok közül a borsmenta illóolaja eredményezte a legnagyobb gátlási zónát tömény és hígított formában egyaránt. Ezt követte a kakukkfű valamint a fahéjkéreg illóolaja. A főkomponensek esetében hasonló tendencia volt megfigyelhető, legnagyobb gátlási zónát a mentol eredményezte, amelyet a timol, a fahéjaldehid és az eugenol követett. Fontos megemlíteni, hogy az illóolaj aktivitása mindig hatásosabbnak bizonyult a komponenshez képest. A leggyengébb aktivitást a szegfűszeg illóolaja mutatta. A negatív kontroll alkalmazása esetén a baktériumtelep teljesen benőtte a Petri-csészét, a pigmentáltság megjelenésével, mivel nem eredményezett gátló hatást, így a táblázatban nem került feltüntetésre (10. táblázat). A biofilm vizsgálatok esetén megfigyeltük, hogy az általunk vizsgált baktériumoknál a borsmenta illóolaja bizonyult legkevésbé eredményesnek. Ezzel szemben a quorum sensing mechanizmus gátlásnál a legeredményesebbnek mondható. A jelenség hátterében az állhat, hogy míg a többi olaj a biofilm strukturális felépítését képes gátolni, addig a borsmenta illóolajának aktivitása a QS mechanizmus (kommunikáció) gátlásában rejlik.

10. táblázat A QS vizsgálatban részt vevő illóolajok által eredményezett gátlási zónák mm-ben kifejezve. (Az eredmények átlag  $\pm$  SD formában kerültek feltüntetésre.)

Minták	Alkalmazott koncentráció		
	2,5 mg/ml	10 mg/ml	tömény
borsmenta	8,32 $\pm$ 0,5	23,12 $\pm$ 0,7	39,28 $\pm$ 0,6
mentol	-	4,2 $\pm$ 0,3	-
fahéjkéreg	5,12 $\pm$ 0,6	18,3 $\pm$ 0,4	33,39 $\pm$ 0,5
fahéjaldehid	-	2,6 $\pm$ 0,2	-
kakukkfű	6,95 $\pm$ 0,6	20,2 $\pm$ 0,5	36,32 $\pm$ 0,9
timol	-	1,54 $\pm$ 0,2	-
szegfűszeg	2,21 $\pm$ 0,3	15,97 $\pm$ 0,2	26,47 $\pm$ 0,3
eugenol	-	1,28 $\pm$ 0,5	-

Eredményeinkből megállapítható, hogy a tömény illóolaj eredményezte a legnagyobb gátlási zónákat, majd a koncentráció csökkenésével a gátlási zónák mérete is csökkent, így egy koncentrációfüggés kialakulását figyelhettük meg. A főkomponensek lényegesen kisebb gátlást eredményeztek az illóolajok aktivitásához képest, így elmondható, hogy a quorum sensing gátlás során az illóolaj komplexitása rendkívül fontos tényező. Mindemellett megállapítottuk, hogy mind a négy illóolaj és főkomponenseik is rendelkeznek QS gátló hatással.

A kakukkfű, a fahéjkéreg illóolajok, valamint főkomponenseik QS gátló hatása bizonyított (Kerekes, 2017). Hasonló módszerrel detektálta Khan és kutatócsoportja a fahéjkéreg és a kakukkfű illóolajok QS gátló hatását. Eredményeik alapján a fahéjkéreg illóolaja intenzívebb gátló hatást eredményezett, a kakukkfű illóolajhoz viszonyítva (Khan et al., 2009). Ahmad és munkacsoportja kimutatta, hogy a timol képes gátolni a QS mechanizmust (Ahmad et al., 2015). Husain és munkatársai a borsmenta illóolajának gátló hatását támasztotta alá (Husain et al., 2015), ám eddigi irodalmi adatok nem állnak rendelkezésünkre a mentol gátló hatásának igazolásával kapcsolatban. Az eugenol QS hatásáról rendelkezésünkre állnak vizsgálatok (Zhou et al., 2013; Rathinam et al., 2017), ám a szegfűszeg anti-QS hatását ezzel a módszerrel még nem bizonyították.

Összességében elmondhatjuk, hogy QS vizsgálataink újabb bizonyítékkal szolgálnak az illóolajok antibakteriális hatásának megerősítése érdekében. Megállapítottuk, hogy a vizsgálatba bevont illóolajok, és azok főkomponensei széleskörű támadási felülettel rendelkeznek a baktériumok tekintetében.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Manapság, amikor a légúti megbetegedések a Föld lakosságát a leginkább veszélyeztető tényezők között szerepelnek, rendkívül nagy jelentősége van azoknak a kutatásoknak, amelyek az ellenük való védekezésre irányulnak. Az antibiotikum-rezisztencia nagymértékű terjedésével párhuzamosan elengedhetetlen az új, akár növényi eredetű antibakteriális vegyületek kutatása, hogy célzottan alkalmazhassuk őket terápiás célra. Az illóolajok már az ókorban ismert és alkalmazott szerek voltak, amelyeket a betegségek tüneti kezelése mellett illatszerként is használtak. Napjainkban az illóolaj-tartalmú készítmények újra reneszánszukat élik, ám megfelelő biztonsággal és hatékonysággal történő alkalmazásukhoz, légúti megbetegedések esetén, jól megtervezett vizsgálatok szükségesek.

Munkánk során négy, a felső légúti megbetegedésekben elterjedten használt illóolaj (borsmenta, fahéjkéreg, szegfűszeg, kakukkfű) alaposabb megismerését tűztük ki célul. A mikrobiológiai *in vitro* rendszerek alkalmasak arra, hogy kísérletes körülmények között modellezzük a baktériumok és a vizsgálati anyag (jelen esetben illóolaj) kölcsönhatását. Az antibakteriális hatást vékonyréteg-kromatográfia-direkt bioautográfia módszerével, valamint biofilm gátló és quorum sensing hatás vizsgálatára alkalmas *in vitro* módszerekkel vizsgáltuk. A biofilm vizsgálatok eredményeinek szemléltetésére scanning elektronmikroszkópos felvételek is készültek. Fontos kiemelni, hogy mivel az illóolajok lipiddoldékonyak, szükség volt olyan fejlesztésre, amely lehetővé tette az illóolajok könnyebb diffundálását vizes közegben. Ennek érdekében sikeresen végeztük el az illóolajok nanotechnológiai formulálását. Az *in vitro* mikrobiológiai vizsgálatok előtt meghatározásra kerültek az általunk használt illóolajok kémiai összetétele is GC-MS és GC-FID módszerekkel, amelyek eredménye alapján a későbbiek során az egyes illóolaj-komponenseket is be tudtuk vonni a vizsgálatokba.

Kutatásunk alapján elmondható, hogy mind a fahéjkéreg, mind pedig a kakukkfű illóolaja alkalmas lehet légúti megbetegedések prevenciójára, valamint a betegségekkel járó fertőzés kezelésére, hiszen hatásos antibakteriális anyagoknak bizonyultak *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *S. pneumoniae*, *S. mutans*, valamint *P. aeruginosa* baktériumokkal szemben is. A fahéjkéreg és a kakukkfű illóolaja mellett nem elhanyagolható a borsmenta és a szegfűszeg illóolajainak hatása sem, hiszen ezek is gátolták a fent említett baktériumok szaporodását és azok biofilm képzését *in vitro* mikrobiológiai rendszerekben.

A biofilm képző mechanizmus pontosabb megismerése érdekében kutatásunk részét képezte a quorum sensing mechanizmus gátlásának tesztelése. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált illóolajok közül a borsmenta illóolaja mutatta a legjobb gátló hatást, annak ellenére, hogy a

biofilm képződést nem tudta hatékonyan gátolni. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy a borsmenta illóolajának hatásossága nem a biofilmet alkotó baktériumsejtek összetapadásának korlátozásában, hanem a baktériumsejtek kommunikációjának gátlásában rejlik.

Új tudományos eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Sikeresen meghatároztuk illóolaj mintáink összetételét GC-MS és GC-FID technikát alkalmazva.
2. Direkt bioautográfia módszerét alkalmazva elsőként bizonyítottuk be a fahéjkéreg, a kakukkfű, a borsmenta és a szegfűszeg illóolajának és azok komponenseinek gátló hatását *Haemophilus* spp. ellen. Összillóolaj vizsgálatok esetén megfigyeltük, hogy a legérzékenyebben a fahéjkéreg és a kakukkfű illóolajával történő kezelésre reagáltak a baktériumok. Kiemelendő a *Haemophilus influenzae*, amely a fahéjkéreg illóolajjal történő kezelés esetén 10,98 mm-es gátlási zónát mutatott. Mindemellett a kakukkfű illóolajával történő kezelés esetén 11,23 mm-es gátlási zónát mérhettünk *S. mutans* esetén. Megállapítottuk, hogy a borsmenta esetén a mentol, az 1,8-cineol, az izomenton, a menton és a mentil-acetát is gátló hatást fejt ki *Haemophilus* spp. törzsek esetén. A módszer sikeres optimalizálásának köszönhetően detektálásra került továbbá, hogy a fahéjkéreg illóolaj esetén az eugenol, a fahéjaldehid, valamint az  $\alpha$ -terpineol fejt ki gátló hatást. Kakukkfű esetén a timol és linalool, szegfűszeg illóolaja esetén pedig az eugenol mellett a limonén gátló hatása volt kimutatható bioautográfias rendszerben. Mindemellett a *Pseudomonas aeruginosa*, valamint *Streptococcus* törzsek esetén is alátámasztottuk mind a négy vizsgált illóolaj komponenseinek gátló hatását bioautográfias tesztrendszerrel alkalmazva. A módszer kiegészülve a preparatív kromatográfias eljárással részletes képet mutat arról, hogy mely illóolaj komponensek mondhatók aktívnak az egyes baktériumtörzsek esetén.
3. Sikeresen alkalmaztuk a mikrodilúciós módszert minimális gátló koncentrációk meghatározásának tekintetében. Megállapítottuk, hogy a borsmenta illóolaja bizonyult a legkevésbé hatásosnak a vizsgált illóolajok közül. Leghatékonyabbnak a fahéjkéreg illóolaja bizonyult, amelynél 0,06 mg/ml-es gátló koncentrációt detektáltunk a *Haemophilus* spp. és a *S. pneumoniae* esetén.
4. Vizsgálataink kitértek az illóolajok Pickering-emulzió formában történő alkalmazására. Megállapítottuk, hogy az illóolajok Pickering-emulziós formulációja a leghatékonyabb az illóolajok biofilm gátlása során, szemben az illóolajok etanos és Tween törzsoldataival

szemben. Eddigi irodalmi adatok nem állnak rendelkezésünkre, amelyek kitérnek a Pickering-emulzióval formulált illóolajok biofilm képződést gátló hatására légúti patogének esetén.

5. Elsőként írtuk le, hogy a biofilm gátlás tekintetében a *Haemophilus* spp. esetén a kakukkfű illóolaja mondható a legaktívabbnak (gátlási ráták: 76,64% és 76,35%) a vizsgálatunkba bevont illóolajok közül.
6. Meghatároztuk, hogy a fahéjkéreg illóolaj a *Streptococcus* sp. képviselői esetén (gátlási ráták: 85,96%, 78,22%), valamint a *Pseudomonas aeruginosa* (gátlási ráta: 80,22%) esetén hatásosabbnak bizonyult a kísérletbe bevont illóolajokhoz képest.
7. Elsőként bizonyítottuk a mentol és a szegfűszeg illóolaj anti-QS hatását.

## 6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abdellatief S. A., Beheiry R.R., El-Mandrawy S.A.M. (2017): Peppermint essential oil alleviates hyperglycemia caused by streptozotocinnicotinamide-induced type 2 diabetes in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 95:990-999.
2. Abdula N., Macharia J., Motsoaledi A., Swaminathan S., Vijay Raghavan K. (2016): National action for global gains in antimicrobial resistance. *Lancet*. 387:3-5.
3. Abreu N.A., Nagalingam N.A., Song Y., Roediger F.C., Pletcher S.D., Goldberg A.N., et al. (2012): Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculoostearicum* enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci Transl Med*. 4:151-124.
4. Adams W.G., Deaver K.A., Cochi S.L., Plikaytis B.D., Zell E.R., Broome C.V., Wenger J.D. (1993): Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *Jama*, 269 :221-226.
5. Adams R.P. (2001): Identification of essential oil components by gas chromatography/quadropole mass spectrometry. 4<sup>th</sup> ed. Allured Publishing. Carol Stream. Illinois. USA
6. Ádám É. (2013): Légúti fertőzéseket okozó baktériumok. In: Ádám Éva: Mikrobiológia. Semmelweis Kiadó, Budapest.
7. Admassie M. (2018): Current review on molecular and phenotypic mechanism of bacterial resistance to antibiotic. *Science Journal of Clinical Medicine*. 7(2): 13-19.
8. Afridi M.S., Ali J., Abbas S., Rehman S.U., Khan F.A., Khan M.A., Shahid M. (2016): Essential oil composition of *Mentha piperita* L. and its antimicrobial effects against common human pathogenic bacterial and fungal strains. *Pharmacology*. 3:90–97.
9. Ahmad, A., Viljoen, A. M., Chenia, H. Y. (2015). The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing. *Lett Appl Microbiol*. 60(1): 8–19.
10. Ahmadi S.G.S., Farahpour M.R., Hamishehkar H. (2019): Topical application of *Cinnamon verum* essential oil accelerates infected wound healing process by increasing tissue antioxidant capacity and keratin biosynthesis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 35 (11) :686-694.
11. Ainane T., Khammour F., Merghoub N. (2019): Cosmetic bio-product based on cinnamon essential oil “*Cinnamomum verum*” for the treatment of mycoses: Preparation, chemical analysis and antimicrobial activity. *MedCrave Online Journal of Toxicology*. 5 (1) :5-8.
12. Al-Ameedi A., Faris J., Rabee A., Naji H., Obayes A., Obaid W. (2017): Analgesic and anti-inflammatory effects of hydro alcoholic extract of *Syzygium aromaticum* in Albino mice. *Journal for Vetrinary Medical Sciences*. 8:56-62.
13. Ali I.B.E.H., Chaouachi M., Bahri R., Chaieb I., Boussaïd M., Harzallah-Skhiri F. (2015): Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. *Reut. Ind. Crops Prod*. 77:631-639.
14. Allegrucci I., Hu F., Shen K., Hayes J., Garth D., Ehrlich J., Post C., Sauer K. (2006): Characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development magee. *J Bacter*. 188 (7):2325-2335.
15. Alma M., Ertas M., Nitz S., Kollmannsberger H.(2007): Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *BioResources*. 2:265-269.
16. Amiri H. (2012): Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 7:1–8.

17. Anderson G.G., Palermo J.J., Schilling J.D., Roth R., Heuser J., Hultgren S.J. (2003): Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. 301:105-107.
18. Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. (2006): Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54:4364–4370.
19. Aparna Y., Narayanan L., Sarada J. (2014): Quorum quenching ability of dietary spice *Cinnamomum verum* on pathogenic bacteria. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 5 (12) :5216.
20. Arslan N., Gurbuz B., Sarihan E.O.(2004): Variation in essential oil content and xcomposition in Turkish anise (*Pimpinella anisum* L.) populations. *Turkish Journal of Agricultural Forestry*. 28:173-177.
21. Auinger P., Lanphear B.P., Kalkwarf H.J., Mansour M.E. (2003): Trends in otitis media among children in the United States. *Pediatrics*. 112:514-520.
22. Azimi P., Ghiasvand R., Feizi A., Hariri M., Abbasi B. (2014): Effects of cinnamon, cardamom, saffron, and ginger consumption on markers of glycemic control, lipid profile, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetes patients. *The Review of Diabetic Studies: RDS*. 11 (3) :258.
23. Bachiega T., Barreto de Sousa J., Bastos J., Sforcin J.M. (2012): Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 64:610-616.
24. Bagge N., Schuster M., Hentzer M., Ciofu O., Givskov M., Greenberg E.P., et al. (2004): *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:1175-1187.
25. Bahramian A., Khoshnood S., Shariati A., Doustdar F., Chirani A.S., Heidary M. (2019): Molecular characterization of the pilS2 gene and its association with the frequency of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pKLC102 and PAPI-1 pathogenicity island. *Infect Drug Resist*. 12:221.
26. Bakaletz L.O. (2009): Chinchilla as a robust, reproducible and polymicrobial model of otitis media and its prevention. *Expert Rev Vaccines*.8:1063-1082.
27. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008): Biological effects of essential oils -a review. *Food Chem Toxicol*. 46: 446-475.
28. Balasubramanian S., Singh K.K., Mohite A.M., Zachariah T.J. (2012): Physical properties of cinnamon bark. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 21 (2) :161-163.
29. Balázs V.L., Horváth B., Kerekes E., Ács K., Kocsis B., Varga A., Böszörményi A., Nagy D., Krisch J., Széchenyi A., Horváth Gy. (2019): Anti-*Haemophilus* activity of selected essential oils detected by TCL-Direct Bioautography and biofilm inhibition. *Molecules*. 24:3301.
30. Baltimore R.S., Christie C.D.C., Smith G.J.W. (1989): Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis: Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am. Rev. Respir. Dis*. 140:1650-1661.
31. Banas J.A., Vickerman M.M. (2003): Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 14:89-99.
32. Baráthné Simkó H. (2014): Öshonos *Thymus* (kakukkfű) taxonok kémiai diverzitásának, valamint termesztési lehetőségének értékelése. Doktori értekezés, Budapest, p. 15-16.



33. Bassis C.M., Tang A.L., Young V.B., Pynnonen M.A. (2014): The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome*. 2:27.
34. Bassolé I.H., Lamien-Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., Novak J., Dicko M. H. (2010): Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*. 15:7825–7839.
35. Bauerle T., Fischer A., Speck T., Bechinger C. (2018): Self-organization of active particles by quorum sensing rules. *Nat. Commun.* 9:8.
36. Behravan J., Ramezani M., Haasanzadeh M.K., Ebadi S. (2007): Evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Zataria multiflora*, *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* by thin layer chromatography-bioautography method. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 10 (3): 259-264.
37. Belfield K., Bayston R., Birchall J., Daniel M. (2015): Do orally administered antibiotics reach concentrations in the middle ear sufficient to eradicate planktonic and biofilm bacteria? A review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 79:296-300.
38. Bellassoued K., Ben Hsouna A., Athmouni K., van Pelt J., Makni Ayadi F., Rebai T., Elfeki A. (2018): Protective effects of *Mentha piperita* L. leaf essential oil against CCl4 induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Lipids Health and Disease*.17(1): 9.
39. Berry R.E., Klumpp D.J., Schaeffer A.J. (2009): Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 77:2762-2772.
40. Bhagavathy S., Latha S. (2015): Anticarcinogenic effects of *Cinnamomum verum* on HL60 leukemia cell lines. *Journal of Pharmacy Research*. 9 (12) :650-661.
41. Bhau B.S., Gogoi G., Baruah D., Ahmed R., Hazarika G., Borah B., Wann S.B. (2015): Development of an effective and efficient DNA isolation method for *Cinnamomum* species. *Food Chem.* 188:264-270.
42. Bjarnsholt T. (2013): The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*.121: 1-58.
43. Bjarnsholt T., Høiby N., Donelli G., Imbert C., Forsberg Å. (2012): Understanding biofilms - are we there yet? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65:125-126.
44. Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Fiandaca M.J., Pedersen J., Hansen C.R., Andersen C.B., et al. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 44:547-558.
45. Blair D., Walker W., Sodeman T., Pagano T. (1977): Bacterial endocarditis due to *Haemophilus parainfluenzae*. *Chest*. 2:146-149.
46. Board N. Handbook on Spices. Asia Pacific Business Press Inc, Delhi, 2010, 199-213.
47. Bogaert D., De Groot R., Hermans P. W. M. (2004): *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect.* 4: 144-154.
48. Boskovic M., Zdravkovic N., Ivanovic J., Janjic J., Djordjevic J., Starcevic M., Baltic M.Z. (2015): Antimicrobial activity of thyme (*Tymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Sci.* 5:18-21.
49. Botz L., Kocsis B., Nagy S. (2001): Detection of microbiologically active compounds. *Planar Chromatograph*. Nyiredi Sz. (Ed). Springer. Budapest. 489-516.
50. Bouyahya A., Et-Touys A., Bakri Y., Talbaui A., Fellah H., Abrini J., Dakka N. (2017): Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microb. Pathog.* 111:41-49.

51. Brahmi F., Khodir M., Mohamed C., Pierre D. (2017): Chemical composition and biological activities of *Mentha* species. InTech: In Aromatic and Medicinal Plants-Back to Nature.
52. Branda S. S., Vik A., Friedman L., Kolter R. (2005): Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13: 20-26.
53. Breidenstein E.B., de la Fuente-Núñez C., Hancock R.E. (2011): *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 19:419-426.
54. Bressler D.C., Balzer M., Dannehl A., Flemming H.C., Wingender J. (2009): Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* drinking-water biofilms on elastomeric material. *Water Sci Technol.* 9: 81-87.
55. Brown M.R., Gilbert P. (1993): Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol.* 74:87-97.
56. Budhani R.K., Struthers J.K. (1997): The use of Sorbarod biofilms to study the antimicrobial susceptibility of a strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 40: 601-602.
57. Burt S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int J Food Microbiol.* 94: 223-253.
58. Bylka W., Witkowska-Banaszczak E., Studzińska-Sroka E., Matławska I. (2012): Phytotherapy of respiratory tract diseases. *Wiad Lek.* 65(2):124-131.
59. Byng I. (2016): Revision of *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) from Comoro archipelago. *Phytotaxa.* 252:162-184.
60. Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Ricke S.C. (2015): Essential oils as antimicrobials in food systems-A review. *Food Control.* 54:111-119.
61. Cassini A., Hogberg L., Plachouras D., Quattrocchi A., Hoxha A., Simonsen G., Colomb-Cotinat M., Kretzschmar M., Devleeschauwer B., Cecchini M., et al. (2019): Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 19: 56-66.
62. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora, R. (2016): Bordetella biofilms: A lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 74 (1):1-8.
63. Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Rewad R.R., Morck D., Buret A. (1999): The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 37:1771-1716.
64. Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Nakbi K.A.B., Rouabhia M., Mahdouani K. et al. (2007): The chemical composition and biological activity of essential oil *Eugenia cryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae). *Phytotherapy Research.* 21:501-506.
65. Chakraborty V., Sankaran M., Ramar D.R., Chellappan (2015): Chemical analysis of leaf essential oil of *Cinnamomum verum* from Palni hills, Tamil Nadu. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences,* 8 (3) :476-479.
66. Chang S.T., Chen P.F., Chang S.C. (2001): Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.* 77:123-127.
67. Chao Y., Marks L. R., Pettigrew M. M., Hakansson A. P. (2015): *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 4: 194-194.
68. Chegini Z., Khoshbayan A., Moghadam T., Farahani I., Jazireian P., Shariati A. (2020): Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Annals of Clin. Microb. Antimic.* 19:45.

69. Chen Z., Xiang J. (2016): Advances in the research of LuxR family protein in quorum-sensing system of gram-negative bacteria. *Chin. J. Burn.* 32:536-538.
70. Chioro A., Coll-Seck A., Hoie B., Moeloek N., Motsoaledi A., Rajatanavin R., Touraine M. (2015): Antimicrobial resistance: A priority for global health action. *Bull. World Health Organ.* 93: 439.
71. Choi O., Cho S.K., Kim J., Park C.G., Kim J. (2016): In vitro antibacterial activity and major bioactive components of *Cinnamomum verum* essential oils against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 6 (4) :308-314.
72. Choma I.M., Grzelak E.M. (2011): Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A.* 19:2684-2691.
73. Chonmaitree T., Trujillo R., Jennings K., Alvarez-Fernandez P., Patel J.A., Loeffelholz M.J., Nokso-Koivisto J., Matalon R., Pyles R.B., Miller A.L., et al. (2016): Acute otitis media and other complications of viral respiratory infection. *Pediatrics.* 2016: 137.
74. Cicinelli E., De Ziegler D., Nicoletti R., Tinelli R., Saliani N., Resta L., Bellavia M., De Vito D. (2009): Poor reliability of vaginal and endocervical cultures for evaluating microbiology of endometrial cavity in women with chronic endometritis. *Gynecol. Obstet. Investig.* 68:108-115.
75. Ciofu O., Tolker-Nielsen T., Jensen P.Ø., Wang H., Høiby N. (2015): Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 85:7-23.
76. Clairoux N., Picard M., Brochu A., Rousseau N., Gourde P., Beauchamp D., Parr Jr. T.R., Bergeron M.G., Malouin F. (1992): Molecular basis of the non- $\beta$ -lactamase-mediated resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1504-1513.
77. Clemente I., Aznar M., Silva F., Nerín C. (2016): Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 36:26-33.
78. Cloete T.E. (2003): Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 51(4): 277-282.
79. Coates H., Thornton R., Langlands J., Fillion P., Keil A.D., Vijayasekaran S., Richmond P. (2008): The role of chronic infection in children with otitis media with effusion: evidence for intracellular persistence of bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 138: 778-781.
80. Cobo F., Jiménez G., Rodriguez G.J., Sampedro A., Martinez L. A., Mari J.M. (2017): Clinical and microbiological findings of septic arthritis caused by *Haemophilus parainfluenzae*. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 47(8):526-531.
81. Coburn B., Wang P.W., Diaz Caballero J., Clark S.T., Brahma V., Donaldson S., et al. (2015): Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci Rep.* 5:102-141.
82. Collins S., Ramsay M., Slack M.P., Campbell H., Flynn S., Litt D., Ladha S.N. (2014): Risk of invasive *Haemophilus influenzae* infection during pregnancy and association with adverse fetal outcomes. *Jama.* 311:1125-1132.
83. Colvin K.M., Gordon V.D., Murakami K., Borlee B.R., Wozniak D.J., Wong G.C., Parsek M.R. (2011): The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 7(1):264.
84. Cortes I.T., Rosalen P.L., Berto L.A., Castro M.L., Pedrini L.D., Porto A.N., Müller K.C., Franco G.C.N. (2021): Effect of adrenaline and noradrenaline on biofilm

- formation and virulence factors of *Streptococcus mutans* UA159. *Archives of Oral Biology*. 125:105-191.
85. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. (2009): Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 326:1694-1697.
  86. Costello R.B., Dwyer J.T., Saldanha L., Bailey R.L., Merkel J., Wambogo E. (2016): Do cinnamon supplements have a role in glycemic control in type 2 diabetes? A narrative review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 116 (11) :1794-1802.
  87. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284:1318-1322.
  88. Costerton J.W., Cheng K-J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M.K., et al. (1987): Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol*. 41:435-464.
  89. Costerton J.W., Ingram J.M., Cheng K-J. (1981):The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann Rev Microbiol*. 35:299-324.
  90. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappinscott H.M. (1995): Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol*. 49:711-745.
  91. Coticchia J.M., Chen M., Sachdeva L., Mutchnick S. (2013): New paradigms in the pathogenesis of otitis media in children. *Front. Pediatr*. 2013:1.
  92. Cowan M.M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 12:564-582.
  93. Crum N.F. (2003): Current trends in typhoid fever. *Curr. Gastroenterol. Rep*. 5:279-286.
  94. Csupor D., Szendrei K. (2012): Gyógynövénytár. Útmutató a korszerű gyógynövény-alkalmazáshoz. 2., bővített, javított kiadás. Medicina kiadó. Budapest.
  95. Dai J.P., Zhao X.F., Zeng J., Wan Q.Y., Yang J.C., Li W.Z. et al. (2013): Drug screening for autophagy inhibitors based on dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza a virus activity. *Plos One*. 8:1-9.
  96. Daniel M., Imtiaz-Umer S., Fergie N., Birchall J., Bayston R. (2012): Bacterial involvement in otitis media with effusion. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 76:1416-1422.
  97. Darras-Joly C., Lortholary O., Mainardi J.L., Etienne J. G. (1997): *Haemophilus* endocarditis: report of 42 cases in adults and review. Haemophilus Endocarditis Study Group. *Clin Infect Dis*. 24:1087-1094.
  98. Davey M.E., O'toole G.A. (2000): Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64(4):847-867.
  99. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. (1998): The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280(5361):295-298.
  100. Davis S.C., Ricotti C., Cazzaniga A., Welsh E., Eaglstein W.H., Mertz P.M. (2008): Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. *Wound Repair Regen*. 16:23-29.
  101. De Guzman C.C., Siemonsma J.S. (1999): Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). Plant Resources of South East Asia, No. 13, Spices. Backhys Pub., Lieden.
  102. Deák, J. (2013): A légúti fertőzések klinikai mikrobiológiája. In: Pál Tibor: Az orvosi mikrobiológia tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.
  103. DeAntonio R., Yarzabal J.-P., Cruz J.P., Schmidt J.E., Kleijnen J. (2016): Epidemiology of otitis media in children from developing countries: A systematic review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 85:65-74.

- 104.Desam N.R., Al-Rajab A.J., Sharma M., Mary Moses M., Reddy G.R., Albratty M. (2017): Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha piperita* L. (Peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University-Science*, 31: 528-533.
- 105.Dibartola A.C., Swearingen M.C., Granger J.F., Stoodley P., Dusane D.H. (2017): Biofilms in orthopedic infections: a review of laboratory methods. *APMIS* 125: 418–428.
- 106.Dobell C. (1960): Antony van Leeuwenhoek and his “Little animals”. New York: Dover Publications INC. 239-255.
- 107.Domenech M., García E., Moscoso M. (2012): Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial biotechnology*. 4 (5):455-465.
- 108.Dorman H.J., Deans S.G. (2000): Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 88(2):308-16.
- 109.Dubost J.J., Soubrier M., Sauvezie B. (2000): Pyogenic arthritis in adults. *Joint Bone Spine*. 67 :11-21.
- 110.Dufour D., Leung V., Lévesque C. (2012): Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 22:2-16.
- 111.Dugoua J., Perri D., Seely D., Ardilouze J., Ridout R., Bowers K., Koren G. (2012): The antidiabetic and cholesterol-lowering effects of common and cassia cinnamon (*Cinnamomum verum* and *C. aromaticum*): A randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12 (1) :179.
- 112.Duraipandiyan V., Ayyanar M., Ignacimuthu S. (2006): Antimicrobial activity of some entho-medicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BCM Complement and Alternative Medicine*. 17:35-42.
- 113.Duzenli A.E., Dwyer J., Jeanne Carey J. (2017): *Haemophilus parainfluenzae*: Endocarditis associated with maxillary sinusitis and complicated by cerebral emboli in a young man. *J.Invest. Med. High Imp. C. Rep*. 2017:1-3.
- 114.Dzarali M., Muthanna A.R., Desa M.N. Taib N.M., Masri S.N. Rahman A.N., Suhaili Z., Soh T., Abdullah F. (2020): Pilus islets and the clonal spread of piliated *Streptococcus pneumoniae*: A review. *Int J Med Microb*. 310(7) :151-449.
115. Edris A.E. (2007): Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*. 21:308-323.
- 116.Ehrlich G.D., Veeh R., Wang X., Costerton J.W., Hayes J.D., Hu F.Z., Daigle B.J., Post J.C. (2002): Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA*. 287:1710-1715.
- 117.El Gendy A.N., Leonardi M., Mugnaini L., Bertelloni F., Ebani V.V., Nardoni S., Mancianti F., Hendawy S., Omer E., Pistelli L. (2015): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. *Ind. Crops Prod*. 67:201-207.
- 118.El Hamdaoui A., Msanda F., Boubaker H., Leach D., Bombarda I., Vanlout P., El Aouad N., Abbad A., Boudyach E.H., Achemchem F., et al. (2018): Essential oil composition, antioxidant and antibacterial activities of wild and cultivated *Lavandula mairei* Humbert. *Biochem. Syst. Ecol*. 76:1-7.
- 119.Elgharably H., Hussain S.T., Shrestha N.K., Blackstone E.H., Pettersson G.B. (2016): Current hypotheses in cardiac surgery: Biofilm in infective endocarditis. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 28:56-59.
- 120.Essid R., Hammami M., Gharbi D., Karkouch I., Hamouda T.B., Elkahoui S., Tabbene O. (2017): Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101 (18) :6993-7006.

121. Evans W.C. (2009): Trease and Evans pharmacognosy, 15th edn. W B Saunders, Naperville.
122. Ezzat S.K., AbuElkhair M.T., Mourad M.I., Helal M.E., Grawish M.E. (2017): Effects of aqueous cinnamon extract on chemically-induced carcinoma of hamster cheek pouch mucosa. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 12 :72-78.
123. Fabio A., Cermelli C., Fabio G., Nicoletti P., Quaglio P. (2007): Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytother Res*. 21:374-377.
124. Fachini-Queiroz F.C., Kummer R., Estevao-Silva C.F., Carvalho M.D., Cunha J.M., Grespan R., Bersani-Amado C.A., Cuman R.K. (2012): Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 9:1-10.
125. Faden H., Duffy L., Wasielewski R., Wolf J., Krystofik D., Tung Y. (1997): Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J. Infect. Dis*. 175: 1440-1445.
126. Fayad N.K., AL-Obaidi O.H., Al-Noor T.H., Ezzat M.O. (2013): Water and alcohol extraction of Thyme plant (*Thymus vulgaris*) and activity study against bacteria, tumors, and used as antioxidant in margarine manufacture. *Innovative Systems Design and Engineering*. 4(1):41-51.
127. Feder H.M. Jr, Roberts J.C., Salazar J., Leopold H.B., Toro-Salazar O. (2003): HACEK endocarditis in infants and children: two cases and a literature review. *Pediatr Infect Dis. J*. 22:557-562.
128. Fergie N., Bayston R., Pearson J., Birchall J. (2004): Is otitis media with effusion a biofilm infection? *Clin. Otolaryngol*. 29:38-46.
129. File T.M., Marrie T.J. (2010): Burden of community-acquired pneumonia in North American adults. *Postgrad Med*. 22:130-141.
130. Filoche S.K., Anderson S.A. and Sissons C.H. (2004): Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology* 19:322-326.
131. Fisher K., Phillips C. (2009): The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol*. 106:1343–1349.
132. Flemming H., Wingender J. (2010): The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 8: 623–633.
133. Fletcher M. (1992): Bacterial metabolism in biofilms. *Biofilms Science and Technology*. 1: 113-124.
134. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., et al. (2012): European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinol. Suppl*. 23:1-298.
135. Foreman A., Boase S., Psaltis A., Wormald P.-J. (2012): Role of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Curr. Allergy Asthma Rep*. 12:127-135.
136. Franklin M.J., Nivens D.E., Weadge J.T., Howell P.L. (2011): Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol*. 22(2):167.
137. Fu Y., Zu Y., Chen L., Shi X., Wang Z., Sun S. (2007): Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Journal of Phytotherapy Research*. 2007; 59:989-990.
138. Fujimoto R.Y., Pereira D.M., Silva J.C.S., de Oliveria L.C.A., Inoue L.A.K.A., Hamoy M. et al. (2017): Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. *Fish Physiology and Biochemistry*. 44:245-256.

139. Fusconi M., Petrozza V., Schippa S., de Vincentiis M., Familiari G., Pantanella F., Cirenza M., Iebba V., Battaglione E., Greco A., et al. (2016): Bacterial biofilm in salivary gland stones: Cause or consequence? *Otolaryngol.-Head Neck Surg.* 2016.
140. Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 176 (2): 269–275.
141. Gergely L. (2003): Az orvosi mikrobiológia. Alliter Kiadói és Oktatásfejlesztő Alapítvány, Budapest
142. Garrett T.R., Bhakoo M., Zhang Z. (2008): Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci.* 18(9):1049-1056.
143. GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators (2018): Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 18(11):1191-1210.
144. Gedikoğlu A., Sökmen M., Çivit A. (2019): Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food science & nutrition.* 7(5):1704-1714.
145. Gill A.O., Holley R.A. (2004): Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5750–5755.
146. Ginat D.T. (2015): Posttreatment imaging of the paranasal sinuses following endoscopic sinus surgery. *Neuroimaging Clin N Am.* 25:653-665.
147. Gishen N.Z., Taddese S., Zenebe T., Dires K., Mengiste B., Shenkute D., Tesema A., Shiferaw Y., Luelekal E. (2020): In vitro antimicrobial activity of six Ethiopian medicinal plants against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Eur. J. Integr. Med.* 36: 101-121.
148. Gloag E.S., Turnbull L., Huang A., Vallotton P., Wang H., Nolan L.M., Mililli L., Hunt C., Lu J., Osvath S.R., Monahan L.G., Cavaliere R., Charles I.G., Wand M.P., Gee M.L., Prabhakar R., Whitchurch C.B. (2013): Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 110(28):11541-11546.
149. Golkar P., Mosavat N., Jalali S.A.H. (2020): Essential oils, chemical constituents, antioxidant, antibacterial and in vitro cytotoxic activity of different *Thymus* species and *Zataria multiflora* collected from Iran. *S. Afr. J. Bot.* 130:250-258.
150. Goudjil M.B., Zighmi S., Hamada D., Mahcene Z., Bencheikh S.E., Ladjel S. (2020): Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae). *S. Afr. J. Bot.* 128:274-282.
151. Goyal M., Kaur H., Bhandari M., Rizvanov A.A., Khaiboullina S.F., Baranwal M. (2018): Antioxidant and immune effects of water soluble polysaccharides isolated from *Cinnamomum verum* bark.
152. Greenberg D. et al. (2006): The contribution of smoking and exposure to tobacco smoke to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* carriage in children and their mothers. *Clin. Infect. Dis.* 42:897-903.
153. Greenwood D., Barer M., Slack R., Irving W. (2012): Medical Microbiology, a Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control (eighteenth. ed.), Leicester, Nottingham
154. Gu X., Keyoumu Y., Long L., Zhang H. (2014): Detection of bacterial biofilms in different types of chronic otitis media. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 271:2877-2883.

155. Guinoiseau E., Luciani A., Rossi P.G., Quilichini Y., Ternengo S., Bradesi P., Berti L. (2010): Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Mic Infect Dis.* 29:873-879.
156. Gulcin I., Elmastas M., Adoul-Enein H.Y. (2012): Antioxidant activity of clove oil-A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry.* 5:489-499.
157. Guleria S., Tiku A.K., Gupta S., Singh G., Koul A., Razdan V.K. (2012): Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory effects of essential oil of *Eucalyptus teretecornis* grown in north-western Himalaya against *Alternaria alternata*. *J Plant Biochem Biotechnol.* 21(1):44-50.
158. Gupta A., Duhan J., Tewari S., Sangwan P., Yadav A. et al. (2013): Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: A preliminary study. *International Endodontic Journal.* 46:775-783.
159. Gupta P., Sarkar S., Das B., Bhattacharjee S., Tribedi P. (2016): Biofilm, pathogenesis and prevention-a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* 198:1-15.
160. Gurib-Fakim A. (2006): Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 27:1-93.
161. Guttman B., Raya R., Kutter E. (2005): Basic phage biology. Bacteriophages. *Biology and applications* 4. 30-63.
162. Hafedh H., Fethi B.A., Mejdj S., Emira N., Bakhrouf A.B. (2010): Effect of *Mentha longifolia* L. ssp. *lognifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:1122-1127.
163. Hajhashemi V., Ghannadi A., Sharif B. (2003): Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.* 89:67-71.
164. Hall C.W., Mah T.F. (2017): Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 41(3): 276-301.
165. Hall-Stoodley L., Hu F.Z., Gieseke A., Nistico L., Nguyen D., Hayes J., Forbes M., Greenberg D.P., Dice B., Burrows A., et al. (2006): Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA.* 296 (2) :1-10.
166. Hammerschmidt S. (2006): Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:12-20.
167. Han X., Parker T.L. (2017): Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. *Pharm. Biol.* 55:1619-1622.
168. Haque S., Ahmad F., Dar S., Jawed A., Mandal R., Wahid M., Lohani M., Khan S., Singh V., Akhter N (2018): Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance. *Microb. Pathog.* 121:293-302.
169. Harrison J. J., Turner R, J., Marques L. L. R., Ceri H. (2005). Biofilms, A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology, *American Scientist*, Vol. 93, No. 6, p. 508
170. Harper D.R., Parracho H.M., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., Lehman S., Morales S. (2014): Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics.* 3:270-284.
171. Harvey R.J., Lund V.J. (2007): Biofilms and chronic rhinosinusitis: Systematic review of evidence, current concepts and directions for research. *Rhinol. J.* 45:3-13.
172. Hazzit M., Baaliouamer A., Verissimo A.R., Faleiro M.L., Miguel M.G. (2009): Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem* 116(3):714-721
173. Hector A., Frey N., Hartl M. (2016): Update on host-pathogen interactions in cystic fibrosis lung disease. *Mol. Cell. Pediatr.* 3:12.



174. Hoa M., Tomovic S., Nistico L., Hall-Stoodley L., Stoodley P., Sachdeva, L., et al. (2009): Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 73: 1242-1248.
175. Høiby N. (1974): *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humoral immune response. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B*. 82:551-558.
176. Høiby N. (1977): *Pseudomonas aeruginosa* Infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 262:1-96.
177. Høiby N. A. (2014): Personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens Dis*. 70:205-211.
178. Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. (2010a): Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35: 322-332.
179. Høiby N., Ciofu O., Bjarnsholt T. (2010b): *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Futur. Microbiol*. 5:1663-1674.
180. Høiby N., Axelsen N.H. (1973): Identification and quantitation of precipitins against *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis by means of crossed immunoelectrophoresis with intermediate gel. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B*. 81:298-308.
181. Høiby N., Bjarnsholt T., Moser C., Bassi G.L., Coenye T., Donelli G., et al. (2015): ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. 21(1):1-26.
182. Høiby N.A. (2017): Short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*. 125:272-275.
183. Horváth B. (2021): Pickering emulziók gyógyszer technológiai alkalmazása vízben nem oldódó hatóanyagok és illóolajok formulálására. Doktori disszertáció, Pécsi Tudományegyetem
184. Horváth B., Balázs V. L., Varga A., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy., Széchenyi A. (2019): Preparation, characterisation, and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. *Scientific Rep*. 9:16611.
185. Horváth Gy., Jámbor N., Végh A., Böszörményi A., Lemberkovics É., Hetényi É., Kovács K., Kocsis B. (2010): Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance J*. 25 (3):178-182.
186. Hossain M.A., AL-Raqmi K.A., AL-Mijizy Z.H., Weli A.M., Al-Riyami Q. (2013): Study of total phenol, flavonoids contents, and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 3(9):705-710.
187. Hood J.R., Wilkinson J.M., Cavanagh M.A.: Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *J. Essent. Oil Res.*, 2003, 15(6): 428-433.
188. Houdkova, M.; Rondevaldova, J.; Dorskocil, I.; Kokoska, L. (2017): Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia*. 118, 56-62.
189. Husain F., Ahmad I., Khan M., Ahmad E., Tahseen Q., Khan M. S., Alshabib N. (2015): Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers of Microbiol*. 16:420.

190. Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L. (2012): Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* 3:1-24.
191. Ikeda T., Sandham H.J. (1971): Prevalence of *S. mutans* on various tooth surfaces in Negro children. *Archives of Oral Biology.* 16 (10): 1237-1240.
192. Imane N.I., Fouzia H., Ahmed E., Ismail G., Idrissa D., Mohamed K.H., Sirine F., L'Houcine, O., Noureddine B. (2020): Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. *Eur. J. Integr. Med.* 35:101-174.
193. Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H. (2001): Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J of Antimicrobial Chemotherapy.* 47:565-573.
194. Iscan G., Kirimer N., Kürkcüoğlu M., Baser K., Demirci F. (2002): Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J of Agricult and Food Chem.* 50:3943-3946.
195. Jafri H., Ahmad I. (2021): In vitro efficacy of clove oil and eugenol against *Staphylococcus* spp, and *Streptococcus mutans* on hydrophobicity, hemolysin production and biofilms and their synergy with antibiotics. *Advances in Microbiology.* 11:20-27.
196. Jagadeesh Babu A., Rupa Sundari A., Indumathi J., Srujan R.V., Sravanthi M. (2011): Study on the Antimicrobial activity and Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils of Spices. *Veterinary World,* 4: 311-316.
197. James G.A., Swogger E., Wolcott R., Pulcini E.D., Secor P., Sestrich J., Costerton J.W., Stewart P.S. (2008): Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 16:37-44.
198. Jesionek W., Dziejczak B. J., Choma I. M. (2017): TLC-direct bioautography as a method for evaluation of antibacterial properties of *Thymus vulgaris* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils of different origin. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 40 (5-6): 292-296.
199. Jayaprakasha G.K., Rao L.J.M. (2011): Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 51(6):547-562.
200. Jeyakumar E., Lawrence R., Pal T. (2011): Comparative evaluation in the efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) oil with standard antibiotics against selected bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 1(2): 253–257.
201. Jiang Q., Chen J., Yang C., Yin Y., Yao K (2019): Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Res. Int.*
202. Jimoh S.O., Arowolo L.A., Alabi K.A. (2017): Phytochemical screening and antimicrobial evaluation of *Syzygium aromaticum* extract and essential oil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 6:4557-4567.
203. Johnson L., Mulcahy H., Kanevets U., Shi Y., Lewenza S. (2012): Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress. *J Bacteriol.* 194(4): 813-826.
204. Jones N. (2001): The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv Drug Deliv Rev.* 51:5-19.
205. Jung H.-S., Ehlers M.M., Lombaard H., Redelinghuys M.J., Kock M.M. (2017): Etiology of bacterial vaginosis and polymicrobial biofilm formation. *Crit. Rev. Microbiol.* 210:1-17.
206. Kalemba D., Kunicka A. (2003): Antibacterial and antifungal properties of essential
207. Kamdem M.S., Sameza M.L., Dongmo P.M., Boyom F.F., Bakargna-Via I., Fokou J.B., Tsague I.F., Menkem E.Z., Zollo P.H., Menut C. (2015): Antiradical, anti-

- inflammatory and antifungal activities of essential oils of two aromatic plants: *Apium graveolens* (Apiaceae) and *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). *Journal of Life Sciences*. 9(23):51-64.
- 208.Kao W.K., Chole R.A., Ogden M.A. (2019): Evidence of a microbial etiology for sialoliths. *Laryngoscope*.130: 69-74.
- 209.Karatan E., Watnick P. (2009): Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 73(2):310-347.
- 210.Kasai H., Shirao M., Ikegami-Kawai M. (2016): Analysis of volatile compounds of clove (*Syzygium aromaticum*) buds as influenced by growth phase and investigation of antioxidant activity of clove extract. *Flavour and Fragrance Journal*. 31:178-184.
- 211.Kaur K., Kaushal S. (2019): Phytochemistry and pharmacological aspects of *Syzygium aromaticum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(1): 398-406.
- 212.Kaur R., Chang A., Xu Q., Casey J.R., Pichichero M.E. (2011): Phylogenetic relatedness and diversity of non-typable *Haemophilus influenzae* in the nasopharynx and middle ear fluid of children with acute otitis media. *J. Med. Microbiol*. 60:1841-1848.
- 213.Kawabata S., Hamada S. (1999): Studying biofilm formation of mutans streptococci. *Methods Enzymol*. 310:513-523.
- 214.Kazemi M., Mousavi E., Bandrez N. (2012): Chemical Compositions and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* and *Tanacetum parthenium*. *Res J Soil Biol*. 4: 21-31.
- 215.Kerekes E., Deák É., Takó M., Tserennadmid R., Petkovits T., Vágvölgyi C., Krisch J. (2013): Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food related microorganisms. *J of App Microbiol*. 115, 933-942.
- 216.Kerekes E. (2017): Illólajok hatása élelmiszeriparban előforduló mikroorganizmusok biofilm képzésére és sejt-sejt közötti kommunikációjára. Szegedi Tudományegyetem.
- 217.Khalil A.F., Elkatry H.O., El Mehairy H.F. (2015): Protective effect of peppermint and parsley leaves oils against hepatotoxicity on experimental rats. *Annals of Agricultural Sciences*. 60: 353-359.
- 218.Khan M.S., Zahin M., Hasan S., Husain F.M. (2009): Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters Applied Microbiology*. 49:354-360.
- 219.Kheawfu K., Pikulkaew S., Chaisri W., Okonogi S. (2017): Nanoemulsion: A suitable nondelivery system of clove oil for anesthetizing Nile tilapia. *Drug Discovery Therapeutics*.11:181-185.
- 220.Khorshidian N., Yousefi M., Khanniri E., Mortazavian A.M. (2018): Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheeses. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 45:62-72.
- 221.Kinnari T.J. (2015): The role of biofilm in chronic laryngitis and in head and neck cancer. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 23:448-453.
- 222.Kissels W., Wu X., Santos R.R. (2017): Short communication: Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: In vitro effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract of calves. *J Dairy Sci*. 100(2):970-974.
- 223.Kon K.V., Rai M.K. (2013): Combining essential oils with antibiotics and other antimicrobial agents to overcome multidrug-resistant bacteria In: Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components. Rai M.K., Kon K.V. (Eds). Elsevier. USA. 149-164.

224. Kosikowska U., Korona-Glowniak I., Niedzielski A., Malm A. (2015): Nasopharyngeal and adenoid colonization by *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in children undergoing adenoidectomy and the ability of bacterial isolates to biofilm production *Medicine (Baltimore)*, 94 :799.
225. Kosikowska U., Malm A. (2009): The preliminary analysis of the ability of biofilm formation in vitro under stationary conditions by *Haemophilus parainfluenzae* isolates from throat of healthy people. *Sepsis*. 2:2003-2006.
226. Kosikowska U., Rybojad P., Stepien-Pysniak D., Zbikowska A., Malm A. (2016): Changes in the prevalence and biofilm formation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* from the respiratory microbiota of patients with sarcoidosis. *BMC Infect Dis* 16:449.
227. Kostyanev T.S., Sechanova L.P. (2012): Virulence factors and mechanisms of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *Folia Med.* 54:19-23.
228. Kothiwale S.V., Patwardhan V., Gandhi M., Sohoni R., Kumar A. (2014): A comparative study of antiplaque and antigingivitis effects of herbal mouthrinse containing tea tree oil, clove, and basil with commercially available essential oil mouthrinse. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 18 (3) :316.
229. Könönen E., Jousimies-Somer H., Bryk A. Kilpi T., Kilian M. (2002): Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J. Med. Microbiol.* 51: 723-730.
230. Krzyściak W., Jurczak A., Kościelniak D., Bystrowska B., Skalniak A. (2014): The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infections Diseases*. 33 (4) :499-515.
231. Ksouda G., Sellimi S., Merlier F., Falcimaigne-Cordin A., Thomasset B., Nasri M., Hajji M. (2019): Composition, antibacterial and antioxidant activities of *Pimpinella saxifraga* essential oil and application to cheese preservation as coating additive. *Food Chem.* 288:47-56.
232. Kumar S., Kumari R., Mishra S. (2019): Pharmacological properties and their medicinal uses of Cinnamomum: a review. 71: (12) 1735-1761.
233. Kumpitsch C., Koskinen K., Schöpf V., Moissl-Eichinger C. (2019): The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biology*. 17 (87):1-12.
234. Kunert A., Losse J., Gruszyn C., Huhn M., Kaendler K., Mikkat S., Volke D., Hoffmann R., Jokiranta T.S., Seeberger H., Moellmann U., Hellwage J., Zipfel P.F. (2007): Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol.* 179: 2979-2988.
235. Kwon H.K., Hwang J.S., So J.S., Lee C.G., Sahoo A., Ryu J.H., Jeon W.K., Ko B.S., Im C.R., Lee S.H., Park Z.Y., Im S.H. (2010): Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NF $\kappa$ B and AP1. *BMC Cancer*. 10: 392-398.
236. Lakshmeesha T.R., Sateesh M.K., Vedashree S., Sofi M.S. (2014): Antifungal activity of *Cinnamomum verum* on Soybean seed-borne *Aspergillus flavus*. *International Journal of Advanced Research*. 2 (5) :1167-1172.
237. Lalami A.E.O., Moukhafi K., Bouslamti R., Lairini S. (2019): Evaluation of antibacterial and antioxidant effects of cinnamon and clove essential oils from Madagascar. *Mater. Today Proc.* 13:762-770.
238. Lauer P., Rinaudo C.D., Soriani M., Margarit I., Maione D., Rosini R., Taddei A.R., Mora M., Rappuoli R., Grandi G., Telford J.L. (2005): Genome analysis reveals pili in group B streptococcus. *Science*. 309:105.
239. Lebeaux D., Ghigo J.M., Beloin C. (2014): Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance towards antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 78:510-543.

- 240.Lee S., Najjah M., Wendy W., Nadirah M. (2009): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromatum* flower bud (clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Frontiers of Agriculture in China. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3:332-336.
- 241.Leid J.G. (2009): Bacterial biofilms resist key host defences. *Microbe* 4(2): 66-70.
- 242.Lemos J.A., Burne R.A. (2008): A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 154:3247-3255.
- 243.Lewis K. (2001): Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 45(4):999- 1007.
- 244.Liao Y., Bernd W.,Crielaard W.,van Loveren C. M. (2017): Fluoride resistance in *Streptococcus mutans*: a mini review. *Journal of Oral Microbiology*. 9 (1): 1-15.
- 245.Liu Q., Meng X., Li Y., Zhao C.N., Tang G.Y., Li H.B. (2017): Antibacterial and antifungal activities of spieces. *Int. J. Mol. Sci*. 18:1283.
- 246.Liu S.-C., Han X.-M., Shi M., Pang Z.-L. (2016): Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the bladders of female patients with sterile urine after antibiotic therapies. *Acta Acad. Med. Wuhan*. 36:710-715.
- 247.Loesche W.J. (1996). Chapter 99: Microbiology of dental decay and periodontal disease. In Baron S.; et al. (eds.). *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). University of Texas Medical Branch.
- 248.Lynch J.P., Zhanel G.G. (2009): *Streptococcus pneumoniae*. Epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Semin Respir Crit Care Med*. 30:189-209.
- 249.Ma Q., Fan X.D., Liu X.C., Qiu T.Q., Jiang J.G. (2015): Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of essential oils from *Kaempferia galangal* L. and their comparative antioxidant activities. *Sep Purif Technol*. 150: 73-79.
- 250.Macfadyen L. P., Redfield R. J. (1996): Life in mucus: sugar metabolism in *Haemophilus influenzae*. *Research in Microbiology*. 147(6-7):541–551.
- 251.Machado D., Castro J., Palmeira-de-Oliveira A., Martinez-de-Oliveira J., Cerca N. (2015): Bacterial vaginosis biofilms: Challenges to current therapies and emerging solutions. *Front. Microbiol*. 6:1-13.
- 252.Mahendran G. & Rahman L. (2020): Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on peppermint (*Mentha x piperita* L.) – A review. *Phytotherapy Res*. 34:2088-2139.
- 253.Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás (2010). IV/A, IV/B kötet. Medicina Könyvkiadó. Budapest. 7721-8030.
- 254.Mah T.F., Pitts B., Pellock B., Walker G.C., Stewart P.S., O'toole G.A (2003): A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 426:306-10.
- 255.Maina I.W., Patel N.N., Cohen N.A. (2018): Understanding the role of biofilms and superantigens in chronic rhinosinusitis. *Curr. Otorhinolaryngol. Rep*. 6:253-262.
- 256.Manconi M., Petretto G., D'hallewin G., Escribano E., Milia E., Pinna R., Palmieri A., Firoznehad M., Peris J.E., Usach I., Fadda A.M. (2018): Thymus essential oil extraction, characterization, and incorporation in phospholipid vesicles for the antioxidant/anti-bacterial treatment of oral cavity diseases. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 171(5):115-22.
- 257.Maric S., Vranes J. (2007): Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period Bilogor*. 109:115-121.
- 258.Marks L.R., Davidson B.A., Knight P.R., Hakansson A.P. (2013): Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *mBio* 2013:4.

259. Martin H.M., Campbell B.J., Hart C., Mporu C., Nayar M., Singh R., Englyst H., Williams H.F., Rhodes J.M. (2004): Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer 1. *Gastroenterol.* 27:80-93.
260. Masotti V., Juteau F., Bessiere J.M., Viano J. (2003): Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51:7115-7121.
261. Matan M. (2012): Antimicrobial activity of edible film incorporated with essential oils to preserve dried fish (*Decapterus maruadsi*). *International Food Research Journal.* 19:1733-1738.
262. Matsumoto-Nakano M. (2018): Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Japanese Dental Science Review.* 54 (1): 22-29.
263. Maunders E., Welch M. (2017): Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation, *FEMS Microbiol. Lett.* 364: 120.
264. May J.R. (1953): The bacteriology of chronic bronchitis. *Lancet.* 534-537.
265. Mazimba O., Wale K., Tebogo E., Kwape O. Shetonde O. (2015): *Cinnamomum verum*: Ethylacetate and methanol extracts antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Plants Studies.* 3 (3) :28-32.
266. McKay D. L., Blumberg J. B. (2006): A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.) *Phytother. Res.*, 20 (8):619-633.
267. Meats E., Feil E., Stringer S., Cody A.J., Goldstein R., Kroll J.S., Popovic T., Spratt B.G. (2003): Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing *J. Clin. Microbiol.* 41:1623-1636.
268. Melvin J.A., Scheller E.V., Miller J.F., Cotter P.A. (2014): Bordetella pertussis pathogenesis: Current and future challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12: 274-288.
269. Meurman J. H. (1988): Ultrastructure, growth, and adherence of *Streptococcus mutans* after treatment with chlorhexidine and fluoride. *Caries Res.* 22:283-287.
270. Middleton A.M., Dowling R.B., Mitchell J.L., Watanabe S., Rutman A., Pritchard K., Tillotson G., Hill S.L., Wilson R. (2003): *Haemophilus parainfluenzae* infection of respiratory mucosa. *Respiratory medicine.* 97:375-381.
271. Mimica-Dukic N., Orcic D., Lesjak M., Šibul F. (2016): Essential oils as powerful antioxidants: Misconception or scientific fact? *Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization.* 12:187-208.
272. Minami M., Kita M., Nakaya T., Yamamoto T., Kuriyama H., Imanishi J. (2003): The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiology and Immunology,* 47(9): 681-684.
273. Mishra R.P., Sharma K. (2014): Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* L. (Clove). *International Research Journal of Biological Science.* 3:22-25.
274. Mitchell C.M., Haick A., Nkwopara E., Garcia R., Rendi M., Agnew K., Fredricks D.N., Eschenbach D. (2015): Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212 (5):611-616.
275. Mittal R., Telischi F.F., Eshraghi A.A., Yan D., Yao Q., Lisi C.V., Mittal J., Narasimhan G., Grati M., Azad R.K., et al. (2015): Current concepts in the pathogenesis and treatment of chronic suppurative otitis media. *J. Med. Microbiol.* 64:1103-1116.
276. Miyashita L., Suri R., Dearing E., Mudway I., Dove R.E., Neill D.R., Van Zyl-Smit R., Kadioglu A., Grigg J. (2018): E-cigarette vapour enhances pneumococcal adherence to airway epithelial cells. *Eur Respir J.* 51:2.
277. Mogosan C., Vostinaru O., Oprean R., Heghes C., Filip L., Balica G., Moldovan R. I. (2017): A comparative analysis of the chemical composition, anti-inflammatory and

- antinociceptive effects of the essential oils from three species of *Mentha cultivated* in Romania. *Molecules*. 22(2): 263.
278. Mohamed M.S.M., Abdallah A.A., Mahran M.H., Shalaby A.M. (2018): Potential alternative treatment of ocular bacterial infections by oil derived from *Syzygium aromaticum* flower (clove). *Current Eye Research*. 74:873-881.
279. Mohd-Zain Z., Kamsani N.H., Ismail I.S., Ahmad N. (2012): Antibiotic susceptibility profile of *Haemophilus influenzae* and transfer of co-trimoxazole resistance determinants. *Trop. Biomed*. 29:372-380.
280. Monasta L., Ronfani L., Marchetti F., Montico M., Brumatti L.V., Bavcar A., Grasso D., Barbiero C., Tamburlini G. (2012): Burden of disease caused by otitis media: Systematic review and global estimates. *PLoS ONE*. 7:136-226.
281. Monnet V., Gardan R. (2015): Quorum-sensing regulators in Gram-positive bacteria: “cherchez le peptide”. *Mol. Microbiol*. 97:181-184.
282. Mora M., Bensi G., Capo S., Falugi F., Zingaretti C., Manetti A.G.O., Maggi T., Taddei A.R., Grandi G., Telford J.L. (2005): Group A streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102:15641-15646.
283. Moreno I., Codoñer F.M., Vilella F., Valbuena D., Martinez-Blanch J.F., Jimenez-Almazán J., Alonso R., Alamá P., Remohí J., Pellicer A., et al. (2016): Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 215: 684-703.
284. Moreno I., Franasiak J.M. (2017): Endometrial microbiota-New player in town. *Fertil. Steril*. 108: 32-39.
285. Mórica M.Á., Häbe T.T., Böszörményi A., Ott P.G., Morlock G.E. (2015): Tracking and identification of antibacterial components in the essential oil of *Tanacetum vulgare* L. by the combination of high performance thin-layer chromatography with direct bioautography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1422:310-317.
286. Moser C., Pedersen H.T., Lerche C.J., Kolpen M., Line L., Thomsen K., Høiby N., Jensen P. Ø. (2017): Biofilms and host response-helpful or harmful. *APMIS*. 125:320-338.
287. Mota A.P.P., Campelo T.A., Frota C.C. (2019): Evaluation of the antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil and trans-cinnamaldehyde against resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioscience Journal*. 35 (1) : 296-306.
288. Moussii I.M., Nayme K., Timinouni M., Jamaledine J., Filali H., Hakkou F. (2020): Synergistic antibacterial effects of Moroccan *Artemisia herba alba*, *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Synergy*. 10:100-157.
289. Murphy T.F. (2015): *Haemophilus* species, including *H. influenzae* and *H. ducreyi* (chancroid) In: Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J. (Eds.), Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of infectious diseases (8th ed.), Elsevier Saunders, Philadelphia, PA. 2575-2583.
290. Murphy T.F., Kirkham C. (2002): Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol*. 2.
291. Mutlu-Ingok A., Devecioglu D., Dikmetas D., Karbancioglu-Guler F., Capanoglu E. (2020): Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic and antioxidant activities of essential oils: An updated review. *Molecules* 25:47.
292. Mutlu-Ingok A., Tasir S., Seven A., Akgun N., Karbancioglu-Guler F. (2019): Evaluation of the single and combined antibacterial efficiency of essential oils for controlling *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and mixed cultures. *Flavour and Fragrance J*. 34 (4):280-287.



293. Myszka K., Czaczyk K. (2012): Mechanisms determining bacterial biofilm resistance to antimicrobial factors. *Antimicrobial Agents*. 26: 215-216.
294. Najm H., Kim M.M. (2013): Eugenol with antioxidant activity inhibits MM-9 related to metastasis in human fibrosarcomacells. *Food Chemical Toxicology*. 55:106-112.
295. Nakano K., Inaba H., Nomura R., Nemoto H., Takeda M., Yoshioka H., Matsue H., Takahashi T., Taniguchi K., Amano A., Ooshima T. (2006): Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and athermatous plaque specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (9): 3313-3317.
296. Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L. (2000): Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31(4):247-256.
297. Naveed R., Hussain I., Tawab A., Tariq M., Rahman M., Hameed S., Iqbal M. (2013): Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against Salmonella and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13 (1) :265.
298. Nemati Z., Barzegar R., Khosravinezhad M., Talebi E., Safaei H.R. (2018): Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi *Thymus vulgaris* essential oil. *Advanced Herbal Medicine*. 4(2):26-32.
299. Nett J. E., Guite K. M., Ringeisen A., Holoyda K. A., Andes D. R. (2008): Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 52: 3411-3413.
300. Nickel J.C., Ruseska I., Wright J.B., Costerton J.W. (1985): Tobramycin resistance of cells of *Pseudomonas aeruginosa* growing as a biofilm on urinary catheter
301. Nilo M.C.S., Riachi L.G., Simas D.L.R., Coelho G.C., da Silva A.J.R., Costa D.C.M., de Maria, C.A.B. (2017): Chemical composition and antioxidant and antifungal properties of *Mentha x piperita* L. (peppermint) and *Mentha arvensis* L. (cornmint) samples. *Food Research*. 1(5): 147–156.
302. Nistico L., Kreft R., Gieseke A., Coticchia J.M., Burrows A., Khampang, P., et al. (2011): Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. *J Clin Microbiol*. 49: 1411-1420.
303. O'Brien K.L., et al. (2009): Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years. Global estimates. *Lancet*. 374:893-902.
304. O'Neil, J. Tackling (2020): Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations; The Review on Antimicrobial Resistance; Wellcome Trust: London, UK, 2016.
305. O'Toole G., Kaplan H., Kolter R (2000): Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 54: 49–79.
306. Oliviero M., Romilde I., Beatrice M.M., Matteo V., Giovanna N., Consuelo A., Claudio C., Giorgio S., Filippo M., Massimo N. (2016): Evaluations of thyme extract effects in human normal bronchial and tracheal epithelial cell lines and in human lung cancer cell line. *Chem Biol Interact*. 256:125-33.
307. Olson P.D., Hunstad D.A. (2016): Subversion of host innate immunity by uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens*. 5 (1):2-15.
308. Ortes-Rojas D.F., Femandes de Souza C.R., Oliveria W.P. (2014): Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedical*. 4:90-96.
309. Otto M. (2013): Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med*. 64:175-188.
310. Pandey A.K., Kumar P., Singh P., Tripathi N.N., Bajpai V.K. (2012): Essential oils: Sources of antimicrobials and activity and inhibitory effects of essential oil of



- Eucalyptus teretecornis* grown in north-western Himalaya against *Alternaria alternata*. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 21:44–50.
- 311.Pang B., Swords W.E (2017): *Haemophilus parainfluenzae* strain ATCC 33392 forms biofilms in vitro and during experimental otitis media infections. *Infection and Immunity.* 85 (9) :1070-1016.
- 312.Papenfort K, Bassler B. (2016): Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14:576-588.
- 313.Park M. et al. (2018): Air pollution influences the incidence of otitis media in children: A national population-based study. *PLOS One.* 13:199-296.a
- 314.Singh P.K. (2003): Bacterial Biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:677-701
- 315.Pasteur L. (1864): Mémoire sur la fermentation acétique. *Ann. Scient. L'Ecole Normale Supérieure* 133-158. (in: Oeuvres des Pasteur, Tome II, Fermentations et generations dites spontanées. (1922), Masson et Cie (Éditeurs), Paris, France).
- 316.Pateiro M., Bara J., Dominguez R., Sant S., Khaneghah A., Gavihan M., Gomez B., Lorenzo M. (2018): Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Research International.* 113: 156-166.
- 317.Pattnaik S., Subramanyam V., Bapaji M., Kole C. (1997): Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.* 89 (358): 39-46.
- 318.Pál T. (2013): Az orvosi mikrobiológia tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.
- 319.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.
- 320.Percival S.L., Hill K.E., Williams D.W., Hooper S.J., Thomas D.W., Costerton J.W. (2012): A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 20:647-657.
- 321.Pérez-Rosés R., Risco E., Vila R., Peñalver P., Cañigüeral S. (2016): Biological and Nonbiological Antioxidant Activity of Some Essential Oils. *J Agric Food Chem.* 64(23):4716-24.
- 322.Perez-Tanoira R., Aarnisalo A., Haapaniemi A., Saarinen R., Kuusela P., Kinnari T.J.(2019): Bacterial biofilm in salivary stones. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 276:1815-1822.
- 323.Perry N.S., Bollen C., Perry E.K., Ballard C. (2003): Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75:651-659.
- 324.Pesavento G., Calonico C., Bilia A.R., Barnabei M., Calesini F., Addona R., Mencarelli L., Carmagnini L., di Martino M.C., Nostro A.L. (2015): Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control.* 54:188-199.
- 325.Petropoulos A.D., Xaplanteri M.A., Dinos G.P., Wilson D.N., Kalpaxis D.L. (2004): Polyamines affect diversely the antibiotic potency: insight gained from kinetic studies of the blasticidin S AND spiramycin interactions with functional ribosomes. *J Biol Chem.* 279(25): 26518- 26525.
- 326.Pillai A., Mitchell J.L., Hill S.L., Stockley R.A. (2000): A case of *Haemophilus parainfluenzae* pneumonia. *Thorax* 55:623–624.
- 327.Pittman S. (2011): Cinnamon: It's not just for making cinnamon rolls. *Ethnobotanical Leaflets* 2000. 2:11.
- 328.Post J.C. (2001): Candidate's Thesis: Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope.* 111:2083-2094.

- 329.Potera C. (2013): Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *National Institute of Environmental Health Sciences*. 121 (2):1-6.
- 330.Purkait S., Bhattacharya A., Bag A., Chattopadhyay R.R. (2020): Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. *Arch. Microbiol.* 1-10.
- 331.Qabaha K., Abu-Lafi S., Al-Rimawi F. (2017): Anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of curcuma longa (Turmeric) and cinnamon (*Cinnamomum verum*). *Journal of Food and Nutrition Research*. 5 (9):668-673.
- 332.Rácz G., Rácz-Kotilla E., Szabó L.Gy. (2012). A fitoterápia és az alternatív medicina alapjai. Galenus Kiadó. Budapest.
- 333.Radünz M., da Trindade M.L.M., Camargo T.M., Radünz A.L., Borges C.D., Gandra E.A., Helbig E. (2019): Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil. *Food Chem.* 276:180–186.
- 334.Rakshit M., Ramalingam C. (2011): In-vitro antibacterial and antioxidant activity of *Cinnamomum verum* (cinnamon) aqueous bark extract in reference to its total phenol content as natural preservative to food. *International Journal of Biotechnology*. 8 (4) :529-537.
- 335.Rali P., Veer M., Gupta N., Singh A.C., Bhanot N. (2016): Opportunistic pulmonary infections in immunocompromised. *Hosts. Crit Care Nurs Q.* 39(2):161-175.
- 336.Ramakrishnan Y., Shields R.C., ElBadawey M.R., Wilson A.J. (2015): Biofilms in chronic rhinosinusitis: What is new and where next? *J. Laryngol. Otol.* 129:744-751.
- 337.Ranasinghe P., Mathangasinghe Y., Jayawardena R., Hills A.P., Misra A. (2017): Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the Asia-Pacific region: a systematic review. *BMC Public Health*. 17(1):101.
- 338.Rasooli I., Rezaei M.B., Allameli A. (2006): Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect Dis.* 10:236-241.
- 339.Rathinam P., Kumar H.S., Viswanathan P. (2017): Eugenol exhibits anti-virulence properties by competitively binding to quorum sensing receptors. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. 33 (8):624-639.
- 340.Ravindran P.N., Babu N.K., Shylaja M. (2003): Cinnamon and Cassia: The genus *Cinnamomum*. *CRC Press*. p. 59.
- 341.Rawat I., Verma N., K Joshi K. (2019): Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). In: Medicinal plants in India: Importance and Cultivation. Chapter 9. Jaya Publishing House, New Delhi, 164-177.
- 342.Remold S.K., Brown C.K., Farris J.E., Hundley T.C., Perpich J.A., Purdy M.E. (2011): Differential habitat use and niche partitioning by *Pseudomonas* species in human homes. *Microb Ecol.* 62:505-510.
- 343.Riachi L.G., de Maria C.A. (2015): Peppermint antioxidants revisited. *Food Chemistry* 176:72–81.
- 344.Rizwana B., Zahurb M., Azharb N., Khalida S., Sajidb N., Qadeer S. (2020): Therapeutic potential of *Thymus vulgaris*: A Review. *The Annals of Research*. 3:147-161.
- 345.Roberts A.L., Connolly K.L., Kirse D.J., Evans A.K., Poehling A.K., Peters,T.R., Reid S.D. (2012): Detection of group A *Streptococcus* in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC Pediatr.* 12 (3):1-9.
- 346.Rodis N., Tsapadikou V.K., Potsios C., Xaplanteri P. (2020): Resistance mechanisms in bacterial biofilm formations: A Review. 4:2-30.

347. Rodriguez W.J., Khan W.H., Sait T., Chhabra O.P., Guarinello A., Smith A.W., Ahmad S. (1990): Sultamicillin (sulbactam/ampicillin) versus amoxicillin in the treatment of acute otitis media in children. *J Int Med Res.* 18(4):78-84.
348. Rohloff J. (1999): Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha × piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (9): 3782-378.
349. Roop R.M., KressBennett J.M., Hiller N.L., Eutsey R.A., Powell E., Longwell M.J., Hillman T., Blackwell T., Byers B., Mell J.C., Post J.C., Hu F.Z., Ehrlich G.D, Janto B.A. (2016): Identification and characterization of msf, a novel virulence factor in *Haemophilus influenzae*. *PLoS One*, 11:149-191.
350. Rozgonyi F. (2003): Az emberi test normál baktériumflórája. In: Gergely L.: Orvosi mikrobiológia. Alliter Kiadó és Oktatásfejlesztő Alapítvány, Budapest
351. Ryan K.J., Ray C.G. (2004): Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill.
352. Rytter H., Jamet A., Coureuil M., Cherbit A., Ramond E. (2020): Which current and novel diagnostic avenues for bacterial respiratory diseases? *Frontiers in Microb.* 11:1-11.
353. Sanchez C.J., Shivshankar P., Stol K., Trakhtenbroit S., Sullam P.M., Sauer K., et al. (2010): The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog.* 6:1044.
354. Sandasi M., Leonard C. M., Van Vuuren S. F., Viljoen A.M. (2011): Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African Journal of Botany.* 77(1): 80-85.
355. Sarkic A., Stappen I. (2018): Essential oils and their single compounds in cosmetics- A critical review. *Cosmetics.* 5(1):11.
356. Sartoratto A., Machado A.L.M., Delarmelina C., Figueira G.M., Duarte M.C.T., Rehder V.L.G. (2004): Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 35(4):275–280.
357. Satmi F. R. S., Hossain, M. A. (2016): In vitro antimicrobial potential of crude extracts and chemical compositions of essential oils of leaves of *Mentha piperita* L. native to the Sultanate of Oman. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering.* 18:103–106.
358. Schilder A.G., Chonmaitree T., Cripps A.W., Rosenfeld R.M., Casselbrant M.L., Haggard M.P., Venekamp R.P. (2016): Otitis media. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2:1-18.
359. Schink K., Naumoska Z., Kitanovski C.J., Kampf J., Fröhlich N. E., Thines K., Lucas K. (2018): Anti-inflammatory effects of cinnamon extract and identification of active compounds influencing the TLR2 and TLR4 signaling pathways. *Food & Function.* 9 (11) :5950-5964.
360. Schotte L., Wautier M., Martiny D., Pierard D., Depypere M. (2019): Detection of beta-lactamase-negative ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* in Belgium. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 93 (2019), pp. 243-249.
361. Schönknecht K., Krauss H., Jambor J., Fal A.M. (2016): Treatment of cough in respiratory tract infections - the effect of combining the natural active compounds with thymol. *Review. Wiad Lek.* 69(6):791-798.
362. Schuenzel K.M., Harrison M.A. (2002): Microbial antagonists of foodborne pathogens
363. Sfeir J., Lefrançois C., Baudoux D., Derbré S., Licznar P. (2013): In vitro antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 1:1-9.

364. Shariati A., Azimi T., Ardebili A., Chirani A., Bahramian A., Pormohammad A., Sadredinamin M., Erfanimanesh S., Bostanghadiri N., Shams S. (2018): Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran Iran. *New Microbes New Infect.* 21:75-80.
365. Sharifi-Rad J., Salehi B., Schnitzler P., Ayatollahi S.A., Kobarfard F., Fathi M., Eisazadeh M., Sharifi-Rad M. (2017): Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oils of *Sinapis arvensis* L., *Lallemantia royleana* Benth. and *Pulicaria vulgaris* Gaertn. *Cell Mol Biol.* (Noisy le Grand). 63(8):42-47.
366. Shen Q., Chen F., Luo J. (2002): Comparison studies on chemical constituents of essential oil from *Ramulus cinnamomi* and *cortex cinnamomi* by GC-MS *Zhong Yao Cai*, 25:257-258.
367. Shilts M.H., Rosas-Salazar C., Tovchigrechko A., Larkin E.K., Torralba M., Akopov A., et al. (2016): Minimally Invasive sampling method identifies differences in taxonomic richness of nasal microbiomes in young infants associated with mode of delivery. *Microb Ecol.* 71:233-242.
368. Shreya A., Manisha D., Sonali J. (2015): Phytochemical screening and anti-microbial activity of cinnamon spice against urinary tract infection and fungal pathogens. *International Journal of Life Science & Pharma Research.* 5 (4) :30-38.
369. Silva J., Abebe W., Sousa S., Duarte V., Machado M.I.L., Matos F.J.A. (2003): Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.* 89:277-283.
370. Singh G., Maurya S., De Lampasona M.P., Catalan C.A. (2007): A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol.* 45(9):1650–1661.
371. Singh N., Rao S.A., Nadal A., Kumar S., Yadav S.S. Ganaie A.S., Narasimhan B. (2021): Phytochemical and pharmacological review of *Cinnamomum verum* J. Presl-a versatile spice used in food and nutrition. *Food Chemistry.* 338:127-173.
372. Singh P.K., Schaefer A.L., Parsek M.R., Moninger T.O., Welsh M.J., Greenberg E.P. (2000): Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 407:762-764.
373. Singh R., Shushni A.M.M., Belkheir A. (2015): Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry.* 8:322–328.
374. Singh S., Singh S.K., Chowdhury I., Singh R. (2017): Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal.* 11: 53-62.
375. Smith C.B., Golden C., Kanner R., Renzetti A. (1976): *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 1253-1255.
376. Socransky S., Haffajee A. (2002): Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 28: 12–55.
377. Sokovic M., Marin P.D., Brkić D., van Griensven L.J. (2007): Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria. *Food 1:* 220–226.
378. Sokovic M.D., Vukojevic J., Marin P.D., Brkic D.D., Vajs V., van Griensven L.J. (2009): Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules* 14:238-249.
379. Solano C., Echeverz M., Lasa I. (2014): Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology.* 18: 96-104.

- 380.Soodaeva S. , Klimanov I., Kubysheva N., Popova N.,Batyrrshin I. (2020): The state of the nitric oxide cycle in respiratory tract diseases. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020:1- 9.
- 381.Starner T.D., Zhang N., Kim G., Apicella M.A., McCray P.B. Jr. (2006): *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: Implications in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 174:213-220.
- 382.Stearns J.C., Davidson C.J., Mckeeon S., Whelan F.J., Fontes M.E., Schryvers A.B., et al. (2015): Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age. *ISME J*. 9:1246-1259.
- 383.Stewart P., Franklin M. (2008): Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 6: 199–210.
- 384.Stewart P.S., Costerton J.W. (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358:135-138.
- 385.Stoodley P., Hall-Stoodley L. (2009): Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol*. 11:1034-1043.
- 386.Suaya, J. A., Fletcher, M. A., Georgalis, L., Arguedas, A., McLaughlin, J. M., Ferreira, G., Verstraeten, T. (2020). Identification of *Streptococcus pneumoniae* in Hospital-acquired Pneumonia in Adults: A Systematic Review. *Journal of Hospital Infection*. 108:146-157.
- 387.Sun Z., Wang H., Wang J., Zhou L., & Yang, P. (2014): Chemical composition and anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil from leaves of *Mentha piperita* grown in China. *PLoS One*. 9(12):114-167.
- 388.Sutherland I. (2001): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147: 3–9.
- 389.Swidsinski A., Loening-Baucke V., Herber A. (2009): Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis-An overview. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc*. 60:61-71.
- 390.Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V., Hale L.P., Lochs H. (2005): Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol*. 43:338-389.
- 391.Syafiq R., Sapuan M., Zuhri R., Ilyas A. Nazrin F., Sherwani K., Khalina A. (2020): Antimicrobial Activities of Starch-Based Biopolymers and Biocomposites Incorporated with Plant Essential Oils: A Review. *Polymers*. 12(10): 2403-2416.
- 392.Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., et al. (2018): Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis*. 18: 318-327.
- 393.Taghouti M., Martins-Gomes C., Schäfer J., Félix L.M., Santos J.A., Bunzel M., Nunes F.M., Silva A.M. (2018): *Thymus pulegioides* L. as a rich source of antioxidant, anti-proliferative, and neuroprotective phenolic compounds. *Food & function*. 9(7):3617-29.
- 394.Taleb A.M., Qannadi F., Changizi-Ashtiyani S., Zarei A., Rezvanfar M.R., Akbari A., Hekmatpou D. (2017):The effect of aqueous extract thymus kotschyanus boiss. Et hohen on glycemic control and dyslipidemia associated with type II diabetes: A randomized controlled trial. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 19(4):234-43.
- 395.Tan K.S., Yan Y., Ong H.H., Chow V.T.K., Shi L., Wang D.-Y. (2017): Impact of respiratory virus infections in exacerbation of acute and chronic rhinosinusitis. *Curr. Allergy Asthma Rep*. 2017:17.

396. Taraszkievicz A., Fila G., Grinholc M., Nakonieczna J. (2013): Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *Bio Med Research International*. 13:150-653.
397. Tariq S., Wani S., Rasool W., Shafi K., Bhat M., Prabhakar A., Shalla H., Rather A. (2019): A review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 134:103-580.
398. Tisserand R., Young R. (2014): Essential Oil Safety - A guide for health care professionals, Second Edition. Tisserand R., Young R. (Eds.). Elsevier. London.
399. Tribedi P., Sil A.K. (2014): Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by *Pseudomonas* sp. AKS2. *J Appl Microbiol*. 116(2):295-303.
400. Tristram S.G., Littlejohn R., Bradbury R.S. (2010): bla<sub>ROB-1</sub> presence on pB1000 in *Haemophilus influenzae* is widespread, and variable cefaclor resistance is associated with altered penicillin-binding proteins. *Antimicrob. Agents Chemother*. 54:4945-4947.
401. Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C. (2005): Mechanisms of antibacterial action of tree monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:2474-2478.
402. Tsang R.S.W., Shuel M., Whyte K., Hoang L., Tyrrell G., Horsman G., Wylie J., Jamieson F., Lefebvre B., Haldane D., Gad R.R., German G.J., Needle R. (2017): Antibiotic susceptibility and molecular analysis of invasive *Haemophilus influenzae* in Canada, 2007 to 2014. *J. Antimicrob. Chemother*. 72:1314-1319.
403. Tu X.F., Hu F., Thakur K., Li X.L., Zhang Y.S., Wei Z.J. (2018): Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. *Ind. Crops Prod*. 124:192-200.
404. Turan N., Chormey D., Buyukpinar C., Engin G., Bakirdere S. (2017): Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. *Trac-Trends Anal. Chem*. 91:1-11.
405. Tyagi A.K., Malik A. (2011): Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*. 22: 1707-1714.
406. Unal C.M., Singh B., Fleury C., Singh K., Chavez de Paz L., Svensater G., Riesbeck K. (2012): QseC controls biofilm formation of non-typeable *Haemophilus influenzae* in addition to an AI-2-dependent mechanism. *Int. J. Med. Microbiol*. 302:261-269.
407. Vaishnavi C., Kochhar R., Singh G., Kumar S., Singh S., Singh K. (2005): Epidemiology of typhoid carriers among blood donors and patients with biliary, gastrointestinal and other related diseases. *Microbiol. Immunol*. 49: 107-112.
408. Vakulenko S.B., Mobashery S. (2003): Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev*. 16:430-450.
409. Van Hoecke H., De Paepe A.-S., Lambert E., Van Belleghem J.D., Cools P., Van Simaey L., Deschaght P., Vanechoutte M., Dhooge I. (2016): *Haemophilus influenzae* biofilm formation in chronic otitis media with effusion. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol*. 273:3553-3560.
410. Van Loveren C. (2001): Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. *Caries Res*. 35 (1):65-70.
411. Vasconcelos N.G., Croda J., Simionatto S. (2018): Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial Pathogenesis*. 120 :198-203.
412. Vasudevan R. (2014): Biofilms: microbial cities of scientific significance. *J Microbiol Exp*. 1(3):14.

413. Verhoeff M., Van Der Veen E.L., Rovers M.M., Sanders E.A., Schilder A.G. (2006): Chronic suppurative otitis media: A review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 70:1-12.
414. Vestby L.K., Grønseth T., Simm R., Nesse L.L. (2020): Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics.* 9(2): 59.
415. Vestby L. K., Møretrø T., Langsrud S., Heir E., Nesse L. L. (2009): Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet Res.* 5(20):1746-6148.
416. Vivek S., Nisha S., Vijaylata P., Reyaz P.M.A., Bikram S., Raghbir, G.C. (2010): GC-MS analysis and anti-microbial activity of essential oil of *Mentha piperita* L. from Kullu-A North Indian region of higher altitude Himalayas. *International Journal of Drug Development & Research.* 2(4):40-46.
417. Vogel A.R., Szelestey B.R., Raffel F.K., Sharpe S.W., Gearinger R.L., Justice S.S., Mason K.M. (2012): SapF-mediated heme-iron utilization enhances persistence and coordinates biofilm architecture of *Haemophilus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2 :42.
418. Wagenlehner F.M.E., Diemer T., Naber K.G., Weidner W. (2008): Chronic bacterial prostatitis (NIH type II): Diagnosis, therapy and influence on the fertility status. *Andrologia.* 40:100-104.
419. Wagner H., Blatt S. (1996): Plant Drug analysis. Springer Berlin. Germany.
420. Wagner V., Filiatrault M., Picardo K., Iglewski B. (2008): *Pseudomonas aeruginosa* virulence and pathogenesis issues. *Pseudomonas* genomics. *Mol Biol.* 2008:129-158.
421. Wang H., Ciofu O., Yang L., Song Z., Olivier A., Høiby N. (2013): High beta-lactamase levels change the pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:196-204.
422. Wang S., Yu K., Yao W., Zhang L., Yuan Y., Wang J., Wei X., Shen Y., Yang Y. (2008): Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* strains and antibiotics usage patterns in pediatric outpatients: results from a children's hospital in China
423. Webster P., Wu S., Gomez G., Apicella M., Plaut A.G., St Geme J.W. (2006): Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable *Haemophilus influenzae* J. *Histochem. Cytochem.* 54:829-842.
424. Wen S., Feng D., Chen D., Yang L., Xu Z. (2020): Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infection, Genetics and Evolution.* 80:1-6.
425. Wei C., Zhao X. (2018): Induction of Viable but Nonculturable Escherichia coli O157:H7 by Low Temperature and Its Resuscitation. *Front. Microbiol.* 9:9.
426. Weidner W., Schiefer H.G., Jantos C., Krauss H., Friedrich H.J., Altmannsberger M. (1991): Chronic prostatitis: A thorough search for etiologically involved microorganisms in 1,461 patients. *Infect.* 19:119-125.
427. Weiss K., et al. (2004): Clinical characteristics at initial presentation and impact of dual therapy on the outcome of bacteremic *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in adults. *Can Respir J.* 11:589-593.
428. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. (2002): Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 295(5559):1487.
429. Whiteley M., Diggle S., Greenberg E. (2017): Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551:313-320.
430. Whiteley M., Bangerter M.G., Bumgarner R.E., Parsek M.R., Teizel G.M., Lory S., et al. (2001): Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature.* 413:860-864.

431. Whittaker R., Economopoulou A., Dias J.G., Bancroft E., Ramliden M., Celentano L.P. (2017): Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 2007–2014. *Emerg. Infect. Dis.* 23:396-404.
432. Wong H. S., Townsend K. M., Fenwick S. G., Trengove R. D., O'Handley R. M. (2010): Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella typhimurium* biofilms to disinfectants. *J Appl Microbiol.* 108: 2222-2228.
433. Woo J.H., Kim S.T., Kang I.G., Lee J.H., Cha H.E., Kim N.Y. (2012): Comparison of tonsillar biofilms between patients with recurrent tonsillitis and a control group. *Acta Oto-Laryngol.* 132: 1115-1120.
434. Wood A.J., Fraser J., Swift S., Amirapu S., Douglas R.G. (2011): Are biofilms associated with an inflammatory response in chronic rhinosinusitis? *Int. Forum Allergy Rhinol.* 1:335-339.
435. World Health Organization. Pneumoniae. Fact sheet N°331, Updated November 2015.
436. Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K.C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., et al. (2002): Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Investig.* 109:317-325.
437. Wu D., Bleier B.S., Wei Y. (2019): Current understanding of the acute exacerbation of chronic rhinosinusitis. *Front. Microbiol.* 9:415.
438. Xu J., Zhou F., Ji B.P., Pei R.S., Xu N. (2008): The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 47:174–179.
439. Xu J.G., Liu T., Hu Q.P., Cao X.M. (2016): Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* 21:1-13.
440. Yadav A.S., Bhatnagar D. (2007): Free radical scavenging activity, metal chelation and antioxidant power of some of Indian spices. *Biofactors.* 31:219-227.
441. Yadav M.K., Goindong Y.Y., Sung-Won J., Chaejun J., Urban S. (2020): Particles elevated *Streptococcus pneumoniae* biofilms, colonization of the human middle ear epithelial cells, mouse nasopharynx and transit to middle ear and lungs. *Scientific Reports.* 10:59-69.
442. Yamashita Y., Bowen W.H., Burne R.A., Kuramitsu H.K. (1993): Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun.* 61:3811-3817.
443. Yang S.K., Yusoff K., Ajat M., Thomas W., Abushelaibi A., Akseer R. (2019): Disruption of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* membrane via induction of oxidative stress by cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl) essential oil. *PLoS One.* 14 (4) :214-326.
444. Yanwei S., Sijia C., Chen Z., Yali L., Li M., Xiangyu Z. (2018): Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 87:235-241.
445. Ye F., He L.X., Cai B.Q., Wen F.Q., Chen B.Y., Hadiarto M., Chen R.C., Yuan J.P., Sun H.L. (2013). Spectrum and antimicrobial resistance of common pathogenic bacteria isolated from patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in mainland of China. *Chin Med J (Engl).* 126:2207-2214.
446. Yen H. F., Hsieh C. T., Hsieh T. J., Chang F. R., Wang C.K. (2015): In vitro antidiabetic effect and chemical component analysis of 29 essential oils products. *Journal of Food and Drug Analysis.* 23:124-129.



447. Yoon B.I., Kim S., Han D.-S., Ha U.-S., Lee S.-J., Kim H.W., Han C.-H., Cho Y.-H. (2012): Acute bacterial prostatitis: How to prevent and manage chronic infection? *J. Infect. Chemother.* 18: 444-450.
448. Yoon S.S., Hennigan R.F., Hilliard G.M., Ochsner U.A., Parvatiyar K., Kamani M.C., Allen H.L., DeKievit T.R., Gardner P.R., Schwab U., et al. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: Relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell.* 3:593-603.
449. Yu C., Wang C.Z., Zhou C.J., Wang B., Han L., Zhang C.F., Yuan C.S. (2014): Adulteration and cultivation region identification of American ginseng using HPLC coupled with multivariate analysis. *J Pharm Biomed.* 99:8-15
450. Yu Y. Y. et al. (2019): Epidemiological characteristics of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* strains among children with pneumonia in Chongqing, China. *Sci. Rep.* 9: 3324.
451. Zähler D., Gudlavalleti A., Stephens D.S. (2010): Increase in pilus islet 2-encoded pili among *Streptococcus pneumoniae* isolates. Atlanta, Georgia, USA *Emerg. Infect. Dis.* 16: 955-962.
452. Zaidi S., Dahiya P. (2015): In vitro antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from *Mentha spicata* and *Mentha piperita*. *International Food Research Journal.* 22(6): 2440–2445.
453. Zaidi S.F, Aziz M., Muhammad J.S., Kadowaki M. (2015): Diverse pharmacological properties of *Cinnamomum cassia*: a review. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28:1433-1438.
454. Zare R., Nadjarzadeh A., Zarshenas M.M., Shams M., Heydari M. (2019): Efficacy of cinnamon in patients with type II diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. *Clinical Nutrition.* 38 (2) :549-556.
455. Zautner A.E. (2012): Adenotonsillar disease. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 6:121-129.
456. Zengin H., Baysal H. (2014): Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. *Journal of Food Processing and Preservation.* 39:1261-1271.
457. Zhang Y., Liu X., Wang Y., Jiang P., Quek S.Y. (2016): Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control.* 59:282-289.
458. Zhang Y., Niu Y., Luo Y., Ge M., Yang T., Yu L.L., Wang Q. (2014): Fabrication, characterization, and antimicrobial activity of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food chemistry.* 142(11):269-75.
459. Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N. (2017): Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives. *RSC Adv.* 7:36670-36683.
460. Zhao X., Zhong J., Wei C., Lin C., Ding T. (2020): Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.* 8.
461. Zhou L., Zheng H., Tang Y., Yu W., Gong Q. (2013): Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology Letters.* 35:631-637.
462. Zielen S., Scheurer J., Rhodius U., Schafer V., Isenberg H., Bauscher P., Schroder S., P. Ahrens P., Hofmann D. (1992): Effectiveness of *Haemophilus influenzae* B-diphtheria conjugate vaccination in German children. *Monatsschr. Kinderh.* 140:852-856.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném megköszönni mindazok segítségét, akik munkám feltételeit biztosították, és együttműködésükkel hozzájárultak a kutatás célkitűzéseinek megvalósításához.

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Horváth Györgyinek a messzemenő támogatást, aki határtalan türelemmel, segítőkészséggel vezette munkámat és hasznos szakmai tanácsokkal látott el.

Köszönetemet fejezem ki konzulensemnek, Dr. Krisch Juditnak, aki munkámat szakmai tapasztalatainak megosztásával segítette.

Köszönettel tartozom Dr. Vörös-Horváth Barbarának, és témavezetőjének Dr. Széchenyi Aleksandarnak, hogy emelték munkám újdonságerejét a nanotechnológiailag formulált minták elkészítésével.

Megköszönöm Dr. Kocsis Bélának és dr. Varga Adorjának, hogy a mikrobiológiai vizsgálatok előkészítésében mindig számíthattam rájuk.

Szeretném megköszönni Dr. Kerekes Erikának, hogy a biofilm képződés gátlás vizsgálatának rejtelseibe bevezetett, így a módszer elsajátítását követően a Pécsi Tudományegyetemen optimalizálhattuk ezt a vizsgálati módszert.

Köszönettel tartozom Petkovits Tamásnak, aki a SEM felvételek elkészítésében volt a segítségemre.

Köszönettel tartozom Dr. Ács Kamillának, aki nehézségek esetén is mindig biztató hozzáállásával segítette munkámat.

Köszönöm továbbá a Pécsi Tudományegyetem GYTK Farmakognóziai Intézet összes munkatársának, akik türelmükkel, tanácsaikkal hozzájárultak munkám végzéséhez.

Szeretném megköszönni Dr. Farkasné Papp Ágnesnek, hogy gimnáziumi tanulmányaim során elindított ezen a pályán. Végül köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akiknek biztató szavai nélkül nem valósulhatott volna meg kutatásom.

## 8. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

### 8.1. Az értekezés alapját képező publikációk

**Balázs V.L.**, Horváth B., Kerekes E., Ács K., Kocsis B., Varga A., Böszörményi A., Nagy D., Krisch J., Széchenyi A., Horváth Gy. (2019): Anti-*Haemophilus* activity of selected essential oils detected by TLC-Direct Bioautography and biofilm inhibition. **MOLECULES**. 24:3301. [IF: 3,286]

Horváth B., **Balázs V.L.**, Varga A., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy., Széchenyi A. (2019): Preparation, characterisation, and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. **SCIENTIFIC REPORTS**. 9:16611. [IF: 3,998]

### 8.2. Egyéb publikációk

**Balázs V.L.**, Filep R., Kerekes E., Szabó P., Kocsis B., Böszörményi A., Krisch J., Horváth Gy. (2022): Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) essential oil showed antibacterial and biofilm inhibitory activity against respiratory tract pathogens. **MOLECULES** 27:5518. [IF:4,148]

Farkas Á., **Balázs V.L.**, Kőszegi T., Csepregi R., Kerekes E., Horváth Gy., Szabó P., Gaál K., Kocsis M. (2022): Antibacterial and biofilm degradation effects of hungarian honeys linked with botanical antioxidant capacity and mineral content. **FRONTIERS IN NUTRITION**. 9:953470. [IF: 6,59]

Tóth M., Papp N., Kerényi M., Balázs V.L., Bartha S., Purger D., Stranczinger Sz. (2022): Study on histological structure and antimicrobial activity of *Lilium candidum* L. **BOTANY LETTERS**. DOI: 10.1080/23818107.2022.2075463. [IF: 1,52]

Schweitzer B., **Balázs V.L.**, Molnár Sz., Szógi-Tatár B., Böszörményi A., Palkovics T., Horváth Gy., Schneider Gy. (2022): Antibacterial effect of lemongrass (*Cymbopogon*

*citratus*) against the aetiological agents of pitted keratolysis. *MOLECULES*. 27:1423. [IF: 4,148]

Czigle Sz., Filep R., Balazova E., Szentgyörgyi H., **Balázs V.L.**, Kocsis M., Purger D., Papp N., Farkas Á. (2022): Antioxidant capacity determination of hungarian-, slovak-, and polish origin goldenrod honeys. *PLANTS*. 11:792. [IF: 3,899]

Csikós E., Horváth A., Ács K., Papp N., **Balázs V.L.**, Dolnes M.S., Kenda M., Glavac N.K., Nagy M., Protti M., Mercolini L., Horváth Gy., Farkas Á. (2021): Treatment of prostatic hyperplasia by natural drugs. *MOLECULES*. 26:7141. [IF: 4,148]

Bakó Cs., **Balázs V.L.**, Takács Gy., Pallos J.P., Pál Sz., Kocsis B., Rippelné Pethő D., Horváth Gy. (2021): Combination of analytical and statistical methods in order to optimize antibacterial activity of clary sage supercritical fluid extracts. *MOLECULES*. 26:6449. [IF: 4,148]

**Balázs V. L.**, Nagy-Radványi L., Filep R., Kerekes E., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. (2021): *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of hungarian honeys against respiratory tract bacteria. *FOODS*. 10:16-32. [IF: 4,121]

**Balázs V.L.**, Filep R., Ambrus T., Kocsis M., Farkas Á., Strancinger Sz., Papp N. (2020): Ethnobotanical, historical and histological evaluation of *Helleborus* L. genetic resources used in veterinary and human ethnomedicine. *GENETIC RESOURCES CROP EVOLUTION*. 65 (3): 865-879. [IF: 1,319]

Kerekes E.B., Vidács A., Takó M., Petkovits T., Vágvölgyi Cs., Horváth Gy., **Balázs V.L.**, Krisch J. (2019): Anti-biofilm effect of selected essential oils and main components on mono- and polimicrobial bacterial cultures. *MICROORGANISMS*. 7:354. [IF:4,152]

Ács K., **Balázs V.L.**, Kocsis B., Bencsik T., Böszörményi A., Horváth Gy. (2018): Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE*. 18 (1): 1-9. [IF: 2,696]

Filep R., Balogh L., **Balázs V.L.**, Farkas Á., Pal R. W., Czigle Sz., Czégényi D., Papp N. (2018): *Helianthus tuberosus* L. agg. in the Carpathian Basin: A blessing or a curse? **GENETIC RESOURCES AND CROP EVOLUTION** 65:(3) pp. 865-879. [IF: 1,294]

Dénes T., Bartha S.G. , Kerényi M., Varga E., **Balázs V.L.**, Csepregi R., Papp N. (2017): Histological and antimicrobial study of *Ononis arvensis* L. **ACTA BIOLOGICA HUNGARICA** 68:(3) pp. 321-333. [IF:0,97]

Papp N., Tóth M., Dénes T., Gyergyák K., Filep R., Bartha S. G., Csepregi R., Balázs V.L., Farkas Á. (2017): Ethnomedicinal treatment of gastrointestinal disorders in Transylvania, Romania. **ACTA ETHNOGRAPHICA HUNGARICA** 62:(1) pp. 207-220. [IF:0,1]

Békési-Kallenberger H., Horváth Gy., Bencsik T., **Balázs V.L.**, Filep R., Papp N. (2016): Comparative Histological and phytochemical study of *Fallopia* species. **NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS** 11:(2) pp. 251-254. [IF: 0,773]

Filep R., Pal R.W., **Balázs V.L.**, Mayer M., Nagy D.U., Cook B.J., Farkas Á. (2016): Can seasonal dynamics of allelochemicals play a role in plant invasions? A case study with *Helianthus tuberosus* L. **PLANT ECOLOGY** 217:(12) pp. 1489-1501. [IF:1,615]

Patay É., Sali N., Kőszegi T., Csepregi R., **Balázs V.L.**, Németh T. S., Németh T., Papp N. (2016): Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. **ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE** 9:(4) pp. 366-371. [IF:0,925]

### **Egyéb, nem impakt faktoros publikációk**

Horváth Gy., Ács K., **Balázs V.L.** (2020): Növényi eredetű antibakteriális anyagok kutatása. In: Dezső K., Molnár F.T. (szerk): Semmelweis felismerésének határokat áttörő üzenete. Semmelweis-émléknep. **MTA Pécsi Akadémiai Bizottság**. 2020: 61-81.

Ács K., Kocsis Béla, **Balázs V. L.**, Kerekes E., Csikós E., Varga A., Krisch J., Vágvölgyi Cs., Horváth Gy. (2018): Illóolajok, illóolaj-komponensek és antibiotikumok együttes alkalmazásának lehetőségei légúti infekciók esetén. *GYÓGYSZERÉSZET*. 62:(2) pp. 73-79.

**Balázs V.L.**, Ács K., Kocsis B., Böszörményi A., Krisch J., Horváth Gy. (2017): Antibacterial effect of cinnamon bark, clove, thyme and peppermint oil against respiratory tract pathogens. *ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA*. 87:(3-4) p. 173.

Békésiné Kallenberger H., Horváth Gy., Balogh L., **Balázs V.L.**, Papp N. (2016): Adventív *Fallopia* taxonok botanikai, fitokémiai és gyógyászati jellemzése *BOTANIKAI KÖZLEMÉNYEK* 103:(1) pp. 119-134.

**Balázs V.L.**, Farkas Á., Papp N., Horváth Gy., Filep R. (2015): Az özönnövényként számon tartott vadcsicsóka (*Helianthus tuberosus* L. s. l.) antimikrobás hatásának vizsgálata. *KALEIDOSCOPE MŰVELŐDÉS- TUDOMÁNY- ÉS ORVOSTÖRTÉNETI FOLYÓIRAT* 6:(11) pp. 281-289.

Filep R., **Balázs V.L.**, Pál R., Farkas Á. (2014): A vadcsicsóka (*Helianthus tuberosus* L. s. l.) gyom- és kultúrfajokra kifejtett allelopátiás hatása. *MAGYAR GYOMKUTATÁS ÉS TECHNOLÓGIA* 15:(1-2) pp. 7-17.

### **Konferencia szereplések**

**Balázs V.L.**, Répás F., Kerekes E., Béla K., Böszörményi A., Szögi-Tatár Bernadett, Krisch J., Horváth Gy. (2022): Antibacterial and antibiofilm effect of wintergreen and immortelle essential oils against *Staphylococcus aureus*. International conference on science, Technology, Engineering and Economy (ICOSTEE). 2022. március 24., Szeged, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 123.

Böszörményi A., Szögi-Tatár B., Horváth A., Balázs V.L., Kovács J., Schneider Gy., Horváth Gy. (2021): 100%-ban tiszta és természetes. Mi rejlik egy illóolajos üvegben?

METT25- A Magyar Elvásztástudományi Társaság jubileumi konferenciája. 2021. október 18-20., Egerszalók, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 8.

Bakó Cs., **Balázs V.L.**, Takács Gy., Pallos J.P., Pál Sz., Kocsis B., Rippelné Pethő D., Horváth Gy. (2021): Muskotályzsálya (*Salvia sclarea* L.) szuperkritikus fluid extraktumok biológiai aktivitásának optimalizálása válaszfelület modellezés segítségével. METT25- A Magyar Elvásztástudományi Társaság jubileumi konferenciája. Egerszalók, Magyarország. 2021. október 18-20., In: Book of Abstracts p. 7.

Schweitzer B., Horváth Gy., **Balázs V.L.**, Mayer A., Schneider Gy. (2021): Antibacterial effect of essential oils against *Cutibacterium acnes*. 6<sup>th</sup> Central European Forum for Microbiology. 2021. október 14-16., Kecskemét, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 11.

**Balázs V.L.**, Nagy-Radványi L., Kocsis B., Farkas Á. (2021): Fajtamézek gátló hatása *Pseudomonas* bakteriális biofilm képzésére. XIX. Szentágothai János Multidiszciplináris Konferencia. 2021. március 26., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 244.

**Balázs V.L.**, Szabó P., Kocsis B., Radványi L., Farkas Á. (2021): Akác, hárs és napraforgó mézek biofilm képződést gátló hatásának szemléltetése scanning electron mikroszkóp segítségével. XVI. Növényanatómiai Szimpózium. 2021. november 12., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p.21.

Böröcz B., Papp N., **Balázs V.L.** (2021): A *Narcissus poeticus* L. hisztológiai vizsgálata. XVI. Növényanatómiai Szimpózium. 2021. november 12., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 16.

Harmath L.É., Papp N., **Balázs V.L.** (2021): Az erdei kutyatej (*Euphorbia amygdaloides* L.) hisztológiai értékelése. XVI. Növényanatómiai Szimpózium. 2021. november 12., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p.17.

Széchenyi A., Vörös-Horváth B., Nagy S., Das S., Kőszegi T., Horváth Gy., **Balázs V.L.**, Varga A., Kocsis B., Pál, Sz. (2020): Targeted delivery of essential oils for pharmaceutical applications. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 90: 2-3 pp. 76., Congressus

Pharmaceuticus Hungaricus, XVI. 2020. szeptember 10-12., Debrecen, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 76.

Ács K., **Balázs V.L.**, Kocsis B., Bencsik T., Böszörményi A., Horváth Gy. (2020): Vapor or liquid form? Differences in the antibacterial activity of essential oils against respiratory tract pathogens. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 90: 2-3 pp. 103. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, XVI. 2020. szeptember 10-12., Debrecen, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 103.

**Balázs V.L.**, Horváth B., Simonics D., Varga A., Kerekes E., Ács K., Kocsis B., Krisch J., Széchenyi A., Horváth Gy. (2020): Antibiofilm effect of pickering nano-emulsion of clove essential oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae*. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 90: 2-3 pp. 105-106. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, XVI. 2020. szeptember 10-12., Debrecen, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 105.

Nagy-Radványi L., **Balázs V.L.**, Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. (2020): Antibacterial activity of domestic acacia, lime and sunflower honeys. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 90: 2-3 pp. 133. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, XVI. 2020. szeptember 10-12., Debrecen, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 133.

Ács K., **Balázs V.L.**, Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2019): Comparative evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase against *Streptococcus mutans*. 50th International Symposium on Essential Oils. 2019. szeptember 9-12., Bécs, Ausztria. In: Book of Abstracts p. 103.

**Balázs V.L.**, Horváth B., Varga A., Kerekes E., Ács K., Kocsis B., Micalizzi G., Mondello L., Krisch J., Széchenyi A. (2019): Antibiofilm effect of pickering nano-emulsion of *Zataria multiflora* Boiss essential oil against *Streptococcus pneumoniae*. 50th International Symposium on Essential Oils. 2019. szeptember 9-12., Bécs, Ausztria. In: Book of Abstracts.p. 76.

**Balázs V.L.**, Horváth B., Varga A., Kerekes E., Ács K., Kocsis B., Mondello L., Krisch J., Széchenyi A., Horváth Gy. (2019): Antibiofilm effect of Pickering nano-emulsion of



*Zataria multiflora* Boiss essential oil against *Pseudomonas aeruginosa*. In: Bódog, Ferenc; Csiszár, Beáta (szerk.): VIII. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2019: absztrakt kötet/8th Interdisciplinary Doctoral Conference 2019. 2019. május 24-25., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 130.

Horváth B., Nagy S., **Balázs V.L.**, Pál Sz., Széchenyi A. (2019): Teafaolajban oldott tiokonazol tartalmú pickering emulziók előállítás és alkalmazása körömgomba helyi kezelésére. I.FKF Fiatal Kémikusok Fóruma, 2019.04.03-05. Debrecen, Magyarország.

Horváth Gy., Simonics D., **Balázs V.L.**, Micallizi G., Mondello L., Kocsis B. (2019): Screening of the anti-*Haemophilus* activity of different lavender oils using TLC-bioautography. 6<sup>th</sup> World Congress on Medical and Aromatic Plants. 2019. november 13-17., Famagusta, Ciprus. In Book of Abstracts p. 131.

Ács K., **Balázs V.L.**, Farkas R., Kerekes E., Kocsis B., Horváth Gy. (2019): Possible interactions between essential oil components and antibiotics in case of resistant pathogens. 6<sup>th</sup> World Congress on Medical and Aromatic Plants. 2019. november 13-17., Famagusta, Ciprus. In Book of Abstracts p. 132.

Ács K., **Balázs V.L.**, Farkas R., Kerekes E., Kocsis B., Horváth Gy. (2018): Essential oil component combinations: possibilities against respiratory tract pathogens. FACTA UNIVERSITATIS SERIES: PHYSICS CHEMISTRY AND TECHNOLOGY. 16 (1): 124. 49<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. 2018. szeptember 13-16., Nis, Serbia. In Book of Abstract p. 35.

Horváth Gy., Ács K., **Balázs V.L.**, Csikós E., Ashraf R.A., Kocsis B., Böszörményi A., Horváth B., Széchenyi A., Kereskai L. et al. (2018): Applicability of cinnamon bark essential oil in respiratory tract diseases—from in vitro to in vivo experiments. FACTA UNIVERSITATIS SERIES: PHYSICS CHEMISTRY AND TECHNOLOGY. 16 (1): 35. 49<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. 2018. szeptember 13-16., Nis, Serbia. In Book of Abstract p. 38.

**Balázs V.L.**, Horváth B., Kerekes E., Széchenyi A., Varga A., Kocsis B., Ács K., Krisch J., Horváth Gy. (2018): The nanotechnological formulation and anti-biofilm activity of

thyme essential oil against *Streptococcus pneumoniae*. FACTA UNIVERSITATIS SERIES: PHYSICS CHEMISTRY AND TECHNOLOGY. 16 (1): 133. 49<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. 2018. szeptember 13-16., Nis, Serbia. In Book of Abstract p. 25.

Horváth B., **Balázs V.L.**, Bárdonicsek N., Pál Sz., Horváth Gy., Széchenyi A. (2018): In vitro diffusion study of tea tree essential oil emulsions stabilized by silica nanoparticles. 11<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. 2018. március 22., Granada, Spanyolország. In: Book of Abstracts p. 67

**Balázs V.L.**, Horváth B., Széchenyi A., Varga A., Kocsis B., Ács K., Kerekes E., Krisch J., Horváth Gy. (2018): A fahéj és a szegfűszeg illóolajának nanotechnológiai formulálása és biofilm-gátló hatásvizsgálata. Gyógyszer innováció Konferencia, Velence.

**Balázs V.L.**, Kerekes E., Ács K., Krisch J., Horváth Gy. (2018): A fahéj, a szegfűszeg, a kakukkfű és a borsmenta illóolajának anti-quorum sensing hatásának vizsgálata. 7<sup>th</sup> Interdisciplinary Doctoral Conference. 2018. május 17-19., Pécs, Magyarország. 173.

Ács K., **Balázs V.L.**, Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2017): A fahéj- és a szegfűszeg illóolaj antimikrobás hatásának vizsgálata rezisztens baktériumtörzseken. Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban Konferencia. 2017. október 27., Pécs Magyarország. In Book of Abstracts p. 60.

Treitz D., Bencsik T., **Balázs V. L.**, Horváth Gy. (2017): Examination of changes in quality of selected essential oils stored at room temperature and under refrigerated conditions. 48<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. 2017. szeptember 10-13. Pécs, Magyarország. NATURAL VOLATILES & ESSENTIAL OILS. 4:(3) p. 69.

**Balázs V.L.**, Ács K., Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2017):Antibacterial evaluation of clove, peppermint and thyme essential oil against *Haemophilus* species. 48<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. 2017. szeptember 10-13. Pécs, Magyarország. NATURAL VOLATILES & ESSENTIAL OILS. 4:(3) p.68.

**Balázs V.L.**, Kocsis B., Kirsch J., Horváth Gy. (2017): TLC-bioautography as an appropriate technique for screening anti-*Haemophilus* activity of essential oils. The 40<sup>th</sup>

Symposium: Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds. 2017. május 23-26. Szczyrk, Lengyelország. In Book of Abstracts p.11.

Ács K., **Balázs V.L.**, Kocsis B., Böszörményi A., Schneider Gy., Móricz Á., Ott P. G., Horváth Gy. (2017): TLC-bioautography: an appropriate test for detection of antibacterial activity of essential oils. The 40<sup>th</sup> Symposium: Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds. 2017. május 23-26. Szczyrk, Lengyelország. p. 19.

Horváthné B. É., Koronya D., **Balázs V.L.**, Farkas Á. (2017): A *Prunus lusitanica* és az *Elaeagnus pungens* levélanatómiai vizsgálata. XV. Magyar Növényanatómiai Szimpózium. 2017. szeptember 7. Budapest, Magyarország. In Books of Abstract p. 31.

Papp N., **Balázs V.L.**, Bartha S. G., Bencsik T., Dénes T., Filep R., Gyergyák K., Patay É., Joós-Békésiné Kallenberger H., Tóth M., Farkas Á. (2017): Gyógynövények hisztológiai értékelése- oktatás és kutatás a pécsi Farmakognóziai Intézetben. XV. Magyar Növényanatómiai Szimpózium. 2017. szeptember 7., Budapest, Magyarország. In Books of Abstract p. 12.

**Balázs V. L.**, Filep R., Papp N. (2016): Hunyor fajok (*Helleborus sp.*) európai elterjedése és népgyógyászati szerepe. XI. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében nemzetközi konferencia. 2016. február 12-14. Budapest, Hungary. In Books of Abstracts p. 119.

**Balázs V. L.**, Pál W. R., Nagy U. D., Farkas Á., Filep R. (2016): A vadcsicsóka (*Helianthus tuberosus* s. l.) honos és adventív fajokra kifejtett allelopátiás hatása. XI. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében nemzetközi konferencia. 2016. február 12-14. Budapest, Hungary. In Books of Abstracts p. 120.

Filep R., **Balázs V.L.**, Balogh L., Czigle Sz., Papp N. (2016): Historical and Ethnobotanical Survey of *Helianthus tuberosus* L. in the Carpathian Basin. 9<sup>th</sup> Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. 2016. május 26-29., Plovdiv, Bulgaria. In Books of Abstract p. 29.

**Balázs V. L.**, Farkas Á., Filep R., Papp N. (2016): Histological study of flower parts in two helleborus species. 9<sup>th</sup> Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. 2016. május 26-29., Plovdiv, Bulgaria. In Books of Abstract p. 30.

**Balázs V.L.**, Papp N. (2014): A *Helleborus purpurascens* szövettani vizsgálata. GYÓGYSZERÉSZET. 58:4. p.81. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., 2014. április 10-12., Budapest, Hungary.

**Balázs V.L.**, Filep R., Bencsik T., Pál R., Farkas Á. (2014):A vadcsicsóka (*Helianthus tuberosus* L.) vizes kivonatának hatása a *Sinapis alba* L. csírázására és növekedésére. X. Aktuális Flóra- és Vegetációkutatás a Kárpát-medencében. 2014. március 6-9. Sopron, Hungary. In Books of Abstracts p. 122.

Filep R., **Balázs V.L.**, Bencsik T., Pál R., Farkas Á. (2014): Allelopathic effects of wild Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in the field and in the laboratory. X. Aktuális Flóra- és Vegetációkutatás a Kárpát-medencében. 2014. március 6-9. Sopron, Hungary. In Books of Abstracts p. 150.

Filep R., **Balázs V.L.**, Bencsik T., Pál R. W., Farkas Á. (2014): Allelopathic effects of wild Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) on some weeds and cultivated species. First Africa International Allelopathy Congress. 2014. február 6-9., Tunézia, Észak-Afrikai Köztársaság. In Books of Abstracts p. 55.

Filep R., **Balázs V. L.**, Czakó VÉR K., Pál R., Farkas Á. (2014): A vadcsicsóka (*Helianthus tuberosus* L.) invázióját segítő tényezők: allelopátia és mikorrhiza. X. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia. 2014. március 27-29., Kolozsvár, Románia. Books of Abstracts p. 32.

## 9. MELLÉKLETEK

### 9.1 Az illóolajok analitikai elemzésének részletes eredményei

#### 9.1.1. A borsmenta illóolaja

A borsmenta illóolajában detektált komponens neve	$t_R$ (min)			
	MS	FID	GC-MS	GC-FID
$\alpha$ -pinén		5,8	1,1	1,1
$\beta$ -pinén	6,9	6,7	0,6	0,6
limonén		7,4	1,4	1,4
<i>p</i> -cimol		7,6	0,2	0,2
1,8-cineol	8,0	7,9	5,5	5,5
izopulegon	10,5	11,1	1,0	1,0
menton	10,6	11,2	19,8	19,8
izomenton	10,8	11,5	7,0	7,0
izomentol	10,9	11,6	4,3	4,3
mentol	11,1	11,9	50,4	50,4
izomentil-acetát	13,1	13,0	5,5	5,5
piperiton	12,6	13,8	0,8	0,8
$\beta$ -kariofillén	15,4	14,8	0,4	0,4
kariofillén-oxid	18,0	18,8	0,1	0,1

$t_R$ : retenció idő

### 9.1.2 A fahéjkéreg illóolaja

A fahéjkéreg illóolajában detektált komponens neve	$t_R$ (min)			
	MS	FID	GC-MS	GC-FID
$\alpha$ -pinén	5,2	7,1	5,1	0,7
benzaldehyd	5,9	7,8	0,1	0,8
<i>p</i> -cimol	7,2	9,1	1,9	1,1
limonén	7,3	9,2	1,8	1,4
cineol	7,4	9,3	2,8	1,7
linalool	8,9	10,7	4,0	3,9
$\alpha$ -terpineol	10,9	12,6	2,2	1,3
<i>transz</i> -fahéjaldehyd	12,8	14,4	64,7	75,1
eugenol	14	15,4	4,6	3,0
$\alpha$ -copaén	14,4	15,9	0,1	0,9
$\beta$ -kariofillén	15,2	16,7	4,2	2,3
cinnamil-acetát	15,6	16,9	9,4	5,6
$\alpha$ -humulén	15,8	17,2	0,5	0,7
metoxy-fahéjaldehyd	17	18,3	0,9	0,9
benzil-benzoát	20,6	21,7	1,2	0,6

$t_R$ : retenciósi idő

### 9.1.3. A kakukkfű illóolaja

A kakukkfű illóolajában detektált komponens neve	t <sub>R</sub> (min)			
	MS	FID	GC-MS	GC-FID
tricyclén	5,0	6,9	0,1	0,1
α-pinén	5,1	7,1	0,9	0,5
kámfén	5,5	7,6	2,0	1,2
β-pinén	6,1	8,2	0,2	0,1
β-mircén	6,3	8,3	1,0	1,0
α-terpinén	7,0	9	3,2	1,7
<i>p</i> -cimol	7,2	9,3	19,2	18,3
1,8-cineol	7,4	9,4	4,6	3,6
γ-terpinén	8,0	9,9	6,7	4,8
terpinolén	8,6	10,4	0,4	0,3
linalool	8,9	10,7	5,6	5,7
izoborneol	10,3	12,1	0,5	0,3
borneol	10,5	12,3	1,0	0,6
terpinen-4-ol	10,6	12,4	0,9	0,8
α-terpineol	10,9	12,8	0,6	0,5
linalil-acetát	12,0	13,3	0,3	0,3
timol	12,9	14,5	39,8	50,8
karvakrol	13,0	14,6	5,9	3,7
neril-acetát	13,9	15,4	0,1	0,1
geranil-acetát	14,3	15,7	0,3	0,6
β-kariofillén	15,2	16,7	4,2	2,9
α-humulén	15,8	17,2	0,3	0,2
kariofillén-oxid	17,9	19,2	0,7	0,7

t<sub>R</sub>: retenciósi idő

### 9.1.4. A szegfűszeg illóolaja

A szegfűszeg illóolajban detektált komponens neve	t <sub>R</sub> (min)			
	MS	FID	GC-MS	GC-FID
eugenol	14,1	15,5	78,8	87,2
β-kariofillén	15,2	16,7	13,5	8,6
α-humulén	15,8	17,2	4,6	2,5
longifolén	16,5	17,8	0,3	0,1
β-kadinén	16,8	18,1	1,1	0,5
kalamenén	16,9	18,2	0,6	0,2
kariofillén-oxid	17,9	19,2	0,8	0,5

t<sub>R</sub>: retenciósi idő

**9.2. A TLC-bioautográfia során alkalmazott preparatív rétegekromatográfia részletes eredményei (a frakciók gyűjtése vékonyréteg-lapról, a frakciók analitikai vizsgálata GC-MS módszerrel történt)**

9.2.1. Borsmenta illóolaja

Borsmenta illóolaj komponensei	tR (min)	Adott frakcióban jelen levő komponensek százalékos aránya (%)					
		1. frakció	2. frakció	3. frakció	4. frakció	5. frakció	6. frakció
$\alpha$ -fellandrén	6,8	1,7					
$\alpha$ -terpinén	7	3,6					
mentatrién	7,2	7,9					
1,8-cineol	7,4				8,9	18,5	
$\gamma$ -terpinén	7,9	7,1					
mentadién	8,6	1,7					
menton	10,1					26,4	74,9
izomenton	10,3					25,3	23,1
izomentol	10,4				27,7	10,6	
mentol	10,5	63,2	100	100	56,3	1,7	
izopulegol	10,6					4	
neoizomentol	10,8				5,5	3,9	
mentenol	10,9	6,3					
pulegon	11,8					9,3	
piperiton	12,1				1,3		
izomentil-acetát	12,7						1,9

tR: retenciós idő

9.2.2 Fahéjkéreg illóolaja

A fahéjkéreg illóolajának komponensei	tR (min)	Adott frakcióban jelen levő komponensek százalékos aránya (%)		
		1. frakció	2. frakció	3. frakció
1,8-cineol	7,4		1,3	
$\alpha$ -terpineol	10,9	100		
fahéjaldehid	12,5		98,6	93,7
anetol	12,7			3,7
$\beta$ -kariofillén	15,2			0,3
fahéj-acetát	15,5			2,1

tR: retenciós idő



### 9.2.3. Kakukkfű illóolaja

Kakukkfű illóolaj komponensei	tR (min)	Adott frakcióban jelen levő komponensek százalékos aránya (%)	
		1. frakció	2. frakció
p-cimol	7,2	100	16,9
1,8-cineol	7,4		4,9
linalool	8,8		57,3
borneol	10,3		9,5
terpinen-4-ol	10,6		11,2

tR: retenció idő

### 9.2.4. Szegfűszeg illóolaja

Szegfűszeg illóolaj komponensei	tR (min)	Adott frakcióban jelen lévő komponensek százalékos aránya (%)		
		1. frakció	2. frakció	3. frakció
limonén	7,3	100	0	
eugenol	14		0	100

tR: retenció idő

Megjegyzés: A 2. frakció nem tartalmazott illékony komponent.

## 9.3. Pickering emulziók stabilitás vizsgálatának eredményei



### Pickering emulziók stabilitás vizsgálatának eredményei

illóolaj	stabilizáló ágens	cseppméret (mm)	stabilitás
szegfűszeg	20 ET	155-1660	2 hét
	Tween80	155-245	2 hét
fahéjkéreg	20 ET	185-250	2 hónap
	Tween80	240-265	3 hét
borsmenta	20 ET	210-11450	4 hónap
	Tween80	255-310	1 hét
kakukkfű	20 ET	155-395	4 hónap
	Tween80	150-240	1 hónap

A stabilizáló szer koncentrációja 1 mg/ml volt minden esetben.

Article

# Anti-*Haemophilus* Activity of Selected Essential Oils Detected by TLC-Direct Bioautography and Biofilm Inhibition

Viktória Lilla Balázs <sup>1</sup>, Barbara Horváth <sup>2</sup>, Erika Kerekes <sup>3</sup>, Kamilla Ács <sup>1</sup>, Béla Kocsis <sup>4</sup>, Adorján Varga <sup>4</sup>, Andrea Böszörményi <sup>5</sup>, Dávid U. Nagy <sup>6</sup> , Judit Krisch <sup>7</sup>, Aleksandar Széchenyi <sup>2</sup>  and Györgyi Horváth <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; balazsviktorialilla@gmail.com (V.L.B.); kamilla.acs@gmail.com (K.A.)

<sup>2</sup> Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; bai0311@gmail.com (B.H.); szealex@gamma.ttk.pte.hu (A.S.)

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, H-6726 Szeged, Hungary; kerekeserika88@gmail.com

<sup>4</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; kocsis.bela@pte.hu (B.K.); adorjanvarga@ymail.com (A.V.)

<sup>5</sup> Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University, H-1085 Budapest, Hungary; aboszormenyi@gmail.com

<sup>6</sup> Department of Genetics and Molecular Biology, Institute of Biology, Faculty of Sciences, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; davenagy9@gmail.com

<sup>7</sup> Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, University of Szeged, H-6724 Szeged, Hungary; krisch@mk.u-szeged.hu

\* Correspondence: horvath.gyorgyi@gytk.pte.hu; Tel.: +36-72-503-625 (ext. 28823)

Received: 7 August 2019; Accepted: 10 September 2019; Published: 11 September 2019



**Abstract:** Essential oils (EOs) are becoming increasingly popular in medical applications because of their antimicrobial effect. Direct bioautography (DB) combined with thin layer chromatography (TLC) is a screening method for the detection of antimicrobial compounds in plant extracts, for example, in EOs. Due to their lipophilic character, the common microbiological assays (etc. disk diffusion) could not provide reliable results. The aim of this study was the evaluation of antibacterial and anti-biofilm properties of the EO of cinnamon bark, clove, peppermint, thyme, and their main components against *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*. Oil in water (O/W) type Pickering nano-emulsions stabilized with silica nanoparticles from each oil were prepared to increase their water-solubility. Samples with Tween80 surfactant and absolute ethanol were also used. Results showed that *H. influenzae* was more sensitive to the EOs than *H. parainfluenzae* (except for cinnamon bark oil). In thin layer chromatography-direct bioautography (TLC-DB) the ethanolic solutions of thyme oil presented the best activity against *H. influenzae*, while cinnamon oil was the most active against *H. parainfluenzae*. Pickering nano-emulsion of cinnamon oil inhibited the biofilm formation of *H. parainfluenzae* (76.35%) more efficiently than samples with Tween80 surfactant or absolute ethanol. In conclusion, Pickering nano-emulsion of EOs could inhibit the biofilm production effectively.

**Keywords:** essential oil; clove; thyme; cinnamon bark; peppermint; anti-biofilm activity; Pickering nano-emulsion; *Haemophilus influenzae*; *Haemophilus parainfluenzae*

## 1. Introduction

Essential oils (EOs) have been widely used for antimicrobial, medicinal and cosmetic purposes. In the European Union, these plant extracts can be found in foods (as flavorings), perfumes (as fragrances) and pharmaceuticals (as active ingredients) [1,2]. The significance of the EOs and their components as antimicrobial substances are increasing, due to antibiotic-resistant pathogens [3,4]. EOs may represent the richest available reservoir of novel therapeutics [5]. However, the reliability of the common antimicrobial assays used for EOs is questionable because of their non-water soluble property [6].

Direct bioautography (DB) combined with thin layer chromatography (TLC) is a rapid and sensitive screening method for the detection of antimicrobial compounds. Test microorganism is capable of growing directly on the TLC plate, so each step of the assay is performed on the sorbent. Similar to the widely used antimicrobial screening methods (e.g., broth macro- and microdilution), thin layer chromatography-direct bioautography (TLC-DB) should be carried out under controlled conditions, since the experimental parameters (for example, solvents, sample application, resolution of compounds, type of test microorganism, incubation time) may influence the result [7]. This assay is capable of testing multicomponent and lipophilic extracts, e.g., EOs. The applicability of bioautography to detect antimicrobial compounds effective against plant and human pathogenic bacteria has been reported in the literature [8–10]. However, there is only a few studies in which respiratory pathogens were included in TLC-DB method [11,12]. According to the data of the World Health Organization (WHO), lower respiratory tract infections are responsible for 5% (3.1 million people) of deaths worldwide [13]. EOs offer effective treatment in the respiratory tract infections because of their volatility and antibacterial effect. We tested other respiratory tract pathogens, such as *Streptococcus* species and *Pseudomonas aeruginosa*, too [14,15]. The mode of action of EOs is not fully understood, but the prevention of the bacterial biofilm formation may be suggested. Therefore, we decided to study the biofilm inhibition potential of our EO samples, including respiratory tract pathogens into our experiments.

A biofilm comprises any group of microorganisms in which cells stick to each other and often also to a surface. These adherent cells become embedded within a slimy extracellular matrix that is composed of extracellular polymeric substances (EPS) [16,17]. Biofilms have been found to be involved in a wide variety of microbial infections (e.g., bacterial vaginosis, urinary tract infections, catheter infections, middle-ear infections) in the body, by one estimate 80% of all infections. About 80% of cystic fibrosis patients have a chronic lung infection, caused mainly by *P. aeruginosa* growing in a non-surface attached biofilms [18]. Infections associated with the biofilm growth usually are challenging to eradicate. It is mostly due to the fact that mature biofilms display tolerance towards antibiotics and the immune response [19]. Most of the publications focus on the inhibition of bacterial biofilm produced by foodborne or dental pathogens [20,21]. Therefore, it was worth involving the pathogens of respiratory tract infections in the studies, in which the effect of our EO samples on biofilm formation produced by respiratory tract bacteria was examined.

Therefore, the aim of this study was the evaluation of antibacterial properties of the EO of cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl.), clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. And Perry), peppermint (*Mentha x piperita* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), and their main components (trans-cinnamaldehyde, eugenol, menthol, and thymol) against the Gram-negative bacteria, *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae* using TLC-DB. Furthermore, the biofilm inhibition of different formulation of our EO samples was also performed. The chemical composition of the EOs was measured by gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

## 2. Results

### 2.1. Chemical Composition of EOs

Chemical analyses of EOs were performed by GC-FID and GC-MS techniques. Identified compounds and percentage evaluation of the oils are shown in Table 1.

Eugenol (78.8%) was the main component in the EO of clove. Cinnamaldehyde (63.7%) was the main component in the oil of cinnamon bark. Menthol (50.4%) was the characteristic compound in the peppermint EO. In the thyme oil thymol (39.8%) was identified as the main constituent.

### 2.2. TLC-DB

#### 2.2.1. Antibacterial Activity of EOs

In the TLC-DB method, the activity of the EOs without and with separation was tested against *H. influenzae* and *H. parainfluenzae*. In the case of activity of the EOs without separation, the development with mobile phase was not prepared; therefore, the activity of the “total” extract (EO) was examined [22]. Figure 1 shows the activity of the EOs without TLC separation. The diameter of the inhibition zones was expressed in cm. From the stock solution of EOs 1  $\mu$ L was applied (equivalent to 0.2 mg undiluted EO) on the TLC plate. The *H. influenzae* was more sensitive to the EOs than *H. parainfluenzae* (except for cinnamon bark oil). Absolute ethanol as negative control did not inhibit the growth of both bacteria. The 0.2  $\mu$ L solution of the antibiotic sample (amikacin, equivalent to 0.05 mg antibiotic) was effective against both *Haemophilus* strains. Ethanolic solutions of thyme oil presented the best activity in case of *H. influenzae*, while cinnamon bark oil was the most potent against *H. parainfluenzae*. Peppermint showed moderate activity in case of both pathogens (0.51 cm against *H. influenzae* and 0.31 cm against *H. parainfluenzae*). In our TLC-DB assay, the tested EO samples did not show more effective activity than the positive control, but their combination (antibiotic and EO) might be the aims of the following assays.

#### 2.2.2. Antibacterial Activity of Main Components of EOs by TLC-DB Method

Generally, the antibacterial activity of the EOs seems to be associated with their most abundant compounds, but the effect of the minor compounds should also be taken into consideration. In the oil of cinnamon bark, cinnamic aldehyde and eugenol components, as well as their standards, showed activity in the case of both bacteria (Figure 2). Moreover,  $\alpha$ -terpineol ( $R_f = 0.35$ ) in the EO of cinnamon showed activity against both bacteria.  $\alpha$ -Terpineol was identified according to the GC-MS result and Wagner and Bladt [23]. Eugenol, as the main compound of the clove oil ( $R_f = 0.52$ ), was active against both *Haemophilus* strains (Figure 2). In the peppermint oil, several compounds had antibacterial activity at the tested concentration. Menthol ( $R_f = 0.31$ ) in the peppermint oil and the standard of menthol inhibited the growth of bacteria (Figure 2). Other active compounds of peppermint oil include 1,8-cineole, isomenthon, menthon, and isomenthyl acetate (according to GC-MS and Wagner and Bladt [23]). In the oil of thyme, thymol-carvacrol and the standard, thymol had antibacterial activity (Figure 2). At  $R_f = 0.33$ , linalool was identified as an active compound according to GC-MS result and Wagner and Bladt [23].

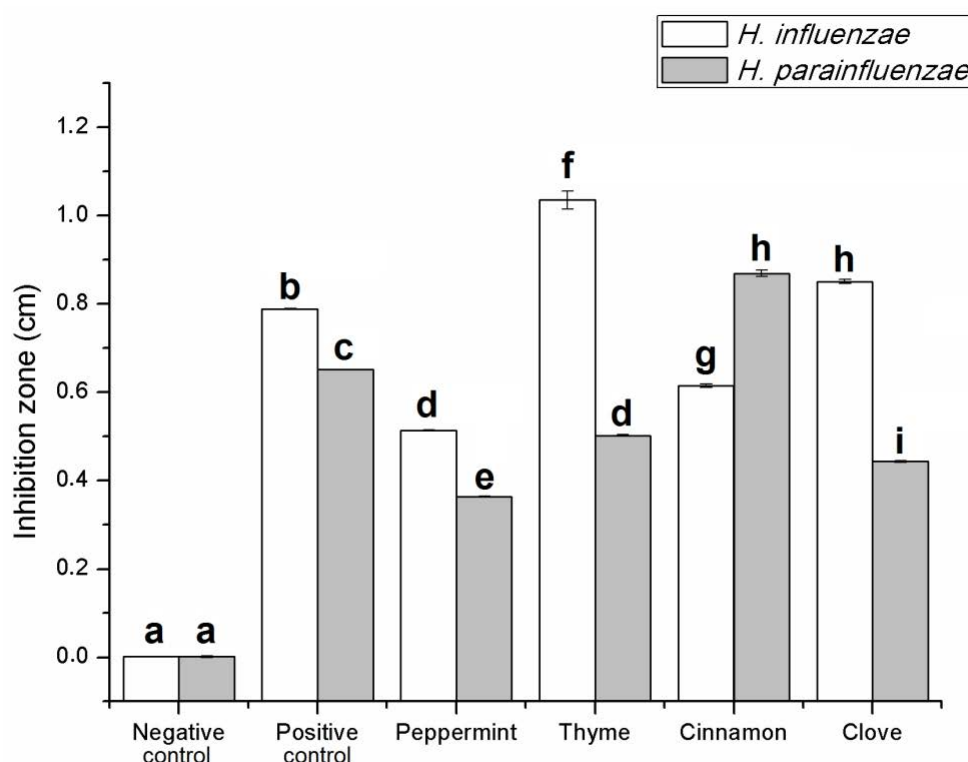
### 2.3. Preparation and Characterization of Pickering Nano-Emulsions of EOs

The preparation of the stable Pickering nano-emulsions has been described before [24]. We had considered the emulsion to be stable when the droplet size did not change for at least 24 h; creaming, sedimentation and disproportionation did not occur. The droplet size and stability of Pickering and conventional emulsions of EOs can be seen in Table 2. The Pickering emulsions are more stable than conventional emulsions, the difference in stability is most obvious in a case of peppermint EO; its Pickering emulsion form remains stable for at least five months, while its conventional emulsion is stable for only one month. In the case of clove EO, there is no difference in stability between the Pickering and conventional emulsions; they remained stable for only two weeks. Conventional

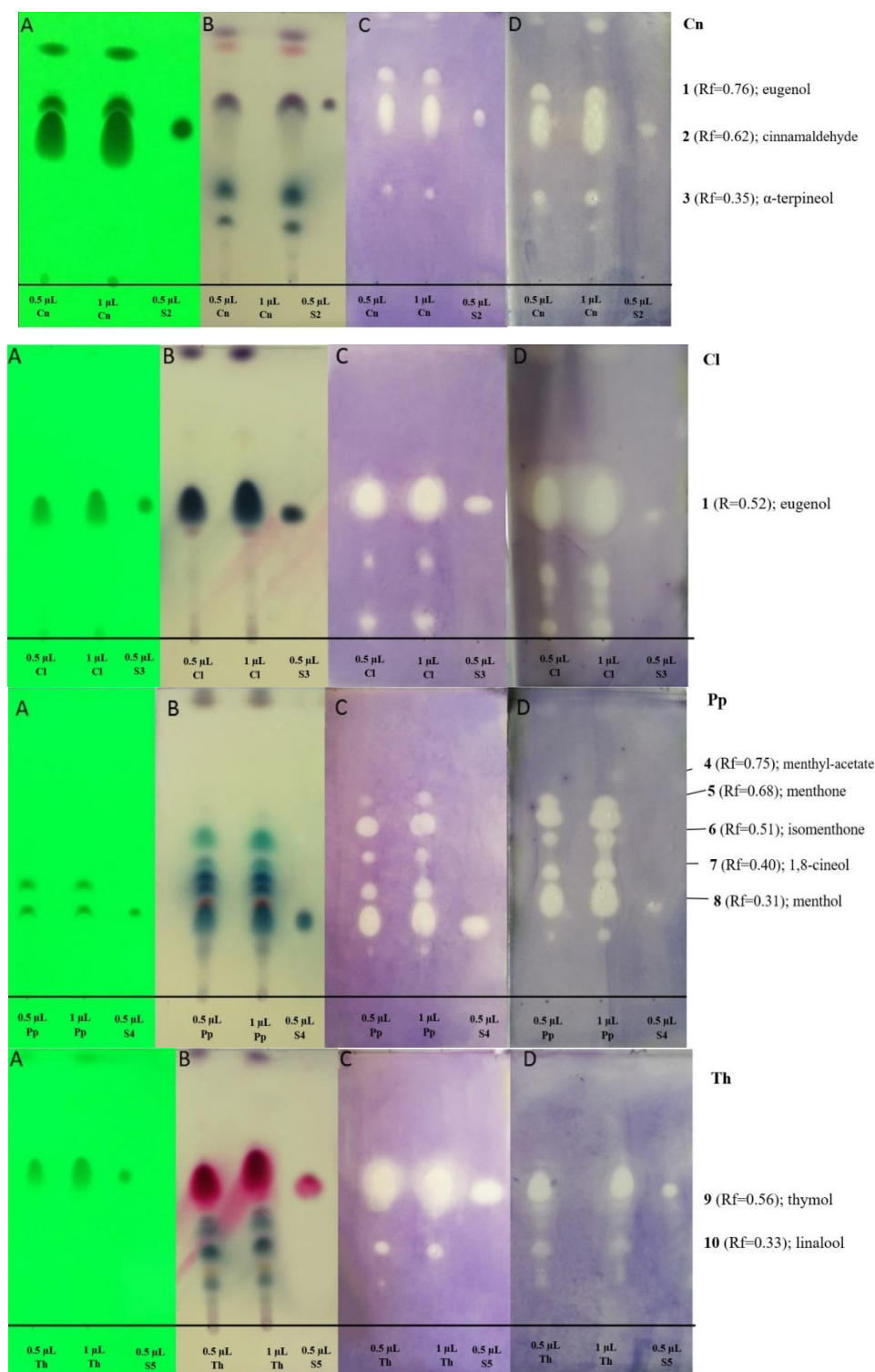
emulsions are stabilized with Tween 80, while Pickering nano-emulsions were stabilized with silica nanoparticles with a mean size of 20 nm and surface modified with ethyl groups (20ET).

#### 2.4. Anti-Biofilm Activity

We examined the inhibitory effect of the EOs (half of the MIC concentration) according to a previous study [25]. Three different formulations of the EOs were tested. The anti-biofilm formation activity of the EOs was calculated and demonstrated in the term of inhibitory rate according to the following equation: Inhibitory rate =  $(1-S/C) \times 100\%$  (C and S were defined as the average absorbance of control and sample groups respectively) [26]. Our results showed that not only the EOs samples with Tween80 surfactant had an antibacterial effect, but also the EO samples with absolute ethanol and their Pickering nano-emulsion forms inhibited the biofilm formation. Among the controls, Pickering nano-emulsion without EO showed the lowest activity (1.49% inhibitory rate) (Figures 3 and 4). It should be highlighted that the Pickering nano-emulsions were the most effective form of EOs against biofilms. The Pickering nano-emulsion of thyme oil showed the highest inhibitory rate (73.64%) against *H. influenzae*. Cinnamon oil in Pickering nano-emulsion form inhibited the biofilm formation of *H. parainfluenzae* (76.35%) most effectively. Among the different formulations, the EO samples with Tween80 showed the lowest activity against biofilm formation. Moreover, in the case of both bacteria, the peppermint oil was the least effective EO among the investigated oil samples. The results of biofilm inhibition assay were in harmony with the results of TLC-DB assay, thyme and cinnamon oils were the most effective among the investigated oils, besides clove also showed potent activity against these respiratory bacteria.

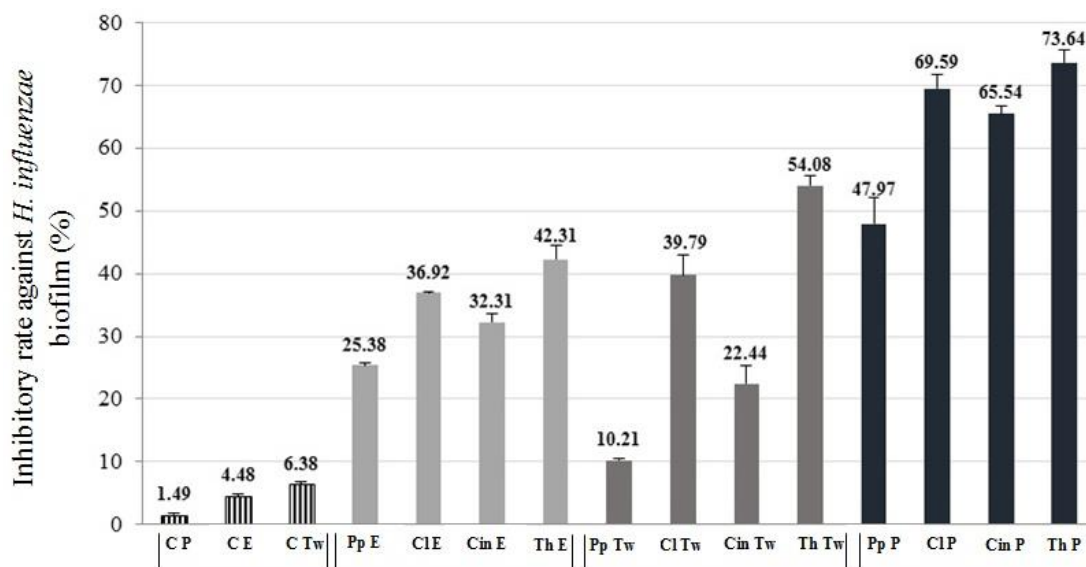


**Figure 1.** Antibacterial activity of essential oils (EOs) used in this study with direct bioautography (without TLC separation). The diameter of the inhibition zones was expressed in cm. Negative control—absolute ethanol; positive control—amikacin (equivalent to 0.05 mg antibiotic); 1  $\mu$ L of EO sample (equivalent to 0.2 mg undiluted EO) was applied. Error bars represent S.E.M. Lowercase letters (a–i) show pairwise comparison based on Tukey post-hoc test,  $p < 0.05$ .

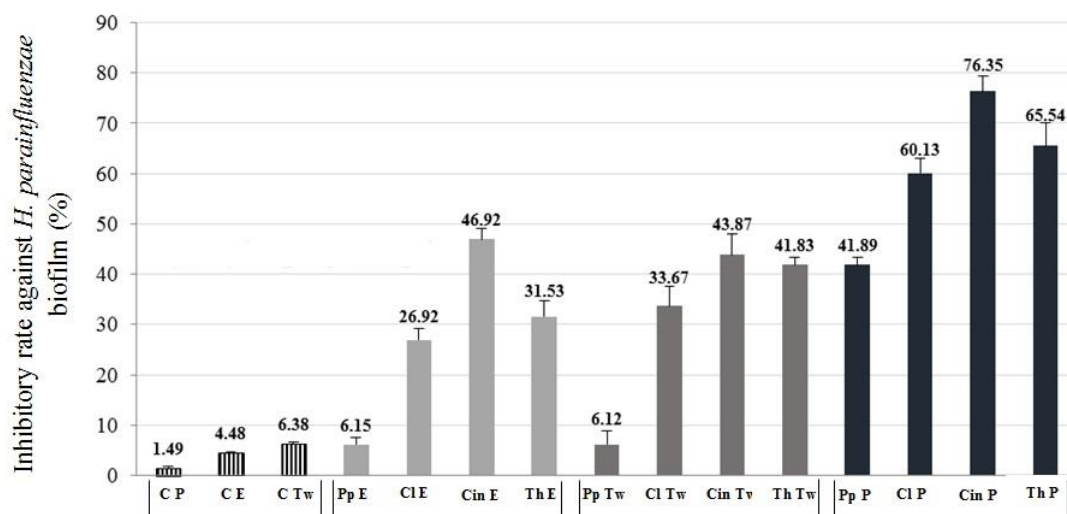


**Figure 2.** Antibacterial components in the EOs used in this study after TLC-DB. Mobile phases: Dichloromethane (only in case of cinnamon bark oil) and toluene-ethyl acetate 93:7 (*v/v*); 0.5 and 1  $\mu$ L indicated the applied volumes of the EO and the standards. (A) TLC plate under UV 254 nm, (B) TLC plate after treatment with vanillin-sulfuric acid reagent and documented in visible light, (C) TLC-DB assay: Bioautograms using *H. influenzae*, (D) TLC-DB assay: Bioautograms using *H. parainfluenzae* (bright zones indicate antibacterial effects); Cn—cinnamon bark oil (200 mg/mL); Cl—clove oil (200 mg/mL); Pp—peppermint oil (200 mg/mL); Th—thyme oil (200 mg/mL); S2—standard of cinnamaldehyde, S3—standard of eugenol, S4—standard of menthol, S5—standard of thymol.





**Figure 3.** Biofilm inhibition activity of different formulated EOs against *Haemophilus influenzae*. C—control; P—Pickering nano-emulsion form; E—samples with absolute ethanol; Tw—samples with Tween80 surfactant; Pp—peppermint EO; Cl—clove EO; Cin—cinnamon EO; Th—thyme EO. The activity of anti-biofilm formation was calculated and demonstrated in the term of inhibitory rate according to the equation:  $\text{Inhibitory rate} = (1 - S/C) \times 100\%$  (C and S were defined as the average absorbance of control and sample groups respectively).



**Figure 4.** Biofilm inhibition activity of different formulated EOs against *Haemophilus parainfluenzae*. C—control; P—Pickering nano-emulsion form; E—samples with absolute ethanol; Tw—samples with Tween80 surfactant; Pp—peppermint EO; Cl—clove EO; Cin—cinnamon EO; Th—thyme EO. The activity of anti-biofilm formation was calculated and demonstrated in the term of inhibitory rate according to the equation:  $\text{Inhibitory rate} = (1 - S/C) \times 100\%$  (C and S were defined as the average absorbance of control and sample groups respectively).

**Table 1.** Average values of volatile compounds from EOs of Peppermint (1), Thyme (2), Clove (3) and Cinnamon (4) from three parallels experiments.

Component	RI	Percentage of Compounds (%)			
		1	2	3	4
$\alpha$ -Pinene	939	1.1	1.0	-	5.1
Camphene	951	-	2.0	-	-
$\beta$ -Myrcene	992	-	1.0	-	-
$\alpha$ -Terpinene	1017	-	3.2	-	-
<i>p</i> -Cymene	1026	-	19.2	-	1.9
Limonene	1044	1.4	-	-	1.8
1,8-Cineole	1046	5.5	4.6	-	2.8
$\gamma$ -Terpinene	1060	-	6.7	-	-
Linalool	1104	-	5.6	-	4.0
Isopulegol	1150	1.0	-	-	-
Menthone	1156	19.8	-	-	-
Isomenthone	1159	7.0	-	-	-
Menthol	1172	50.4	-	-	-
Isomenthol	1183	4.3	-	-	-
$\alpha$ -Terpineol	1190	-	-	-	2.2
Pulegone	1215	1.9	-	-	-
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	1266	-	-	-	63.7
Bornyl acetate	1289	-	1.0	-	-
Thymol	1297	-	39.8	-	-
Isomenthyl acetate	1305	5.5	-	-	-
Eugenol	1373	-	-	78.8	4.6
$\beta$ -Elemene	1394	-	-	-	-
$\beta$ -Caryophyllene	1417	1.3	4.2	13.5	4.2
Cinnamyl acetate	1446	-	-	-	9.4
$\alpha$ -Humulene	1452	-	-	4.6	-
$\beta$ -Cadinene	1473	-	-	1.1	-
Total:	-	99.2	88.3	98.0	99.7

**Table 2.** Properties of Pickering and conventional emulsions of essential oils. Droplet sizes were determined with DLS measurements. Three parallel samples and measurements were made.

Properties of Pickering and Conventional Emulsions of Essential Oils				
Essential Oil	Coil (mg/mL)	Stabilizing Agent	Droplet Size (nm)	Stability
Cinnamon bark EO	0.03	20ET nanoparticles	256.2 $\pm$ 12.3	2 months
	0.03	Tween80	274.5 $\pm$ 28.5	1 month
Clove EO	0.125	20ET nanoparticles	184.6 $\pm$ 8.8	2 weeks
	0.125	Tween80	185.2 $\pm$ 10.7	2 weeks
Peppermint EO	0.105	20ET nanoparticles	308.7 $\pm$ 15.5	5 months
	0.105	Tween80	248.9 $\pm$ 4.	1 months
Thyme EO	0.055	20ET nanoparticles	180.5 $\pm$ 6.4	4 months
	0.055	Tween80	163.2 $\pm$ 1.3	1 month

### 3. Discussion

Plants produced a wide variety of secondary metabolites that exhibited antimicrobial activity against a variety of pathogens (bacteria, fungi, and viruses) [27–29]. Several suggestions, (or hypothesis) can be found in the literature about their antifungal, and antibacterial mode of action, but some of them need clarification. In this study, the antibacterial and anti-biofilm effects of clove, cinnamon, thyme, and peppermint oils were investigated against *H. influenzae* and *H. parainfluenzae*. The most accepted mechanism of EOs revealed that they could disrupt cell wall and cytoplasmic membrane, leading to lysis and leakage of intracellular compounds [12,30–32]. Many bacteria disclosed a high sensitivity to



EOs, especially *H. influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, and *S. agalactiae*. Cinnamon, thyme and clove oils showed the strongest inhibitory activity against several bacteria, including *H. influenzae*, *S. pyogenes* and *S. agalactiae*, even against multi-resistant strains [11]. However, the common antibacterial assays (e.g., disk diffusion) are not an appropriate method for non-water soluble extracts and compounds. Therefore, in this study, we focused on the antibacterial potential and anti-biofilm activity of clove, cinnamon, thyme and peppermint oils against *H. influenzae* (DSM 4690) and *H. parainfluenzae* (DSM 8978) using TLC-DB and biofilm inhibitory assays.

TLC-DB is a directly combined application of an analytical method with an in situ bioassay that allows rapid identification of the active compound or compounds in a complex mixture. To the best of our knowledge, we optimized this technique first using *Haemophilus* species. The TLC-DB was optimized for two *Haemophilus* species, but it is necessary to note that attention should be paid to the parameters (e.g., incubation time, the composition of agar for growing the bacterium, etc.) of TLC-DB, which was also confirmed in a previous study [7].

Fabio et al. described that *Haemophilus* species were sensitive to EOs in the following order: Thyme, cinnamon, clove, eucalyptus, sage, and lavender. We determined the highest activity of the thyme, cinnamon, and clove against *H. influenzae* and *H. parainfluenzae*, which was in parallel with the previous observations [12,14].

Our findings showed similar results with Houdkova and co-workers's [33] and Inouye and co-workers' [12] results regarding the activity of menthol, menthone and their derivatives, because these EO components are highly responsible for the anti-*Haemophilus* activity. In our research, TLC-DB was optimized with *Haemophilus* species, which is an appropriate assay to detect the antimicrobial activity of EO main compounds. We demonstrated the anti-*Haemophilus* effect of cinnamaldehyde, thymol, menthol, and eugenol. Moreover, some minor components (menthone, isomenthyl acetate, 1,8-cineole,  $\alpha$ -terpineole, and linalool) contributed to the antibacterial activity.

In the last decade, the role of natural products derived from medicinal plants for interfering pathogenic biofilms has gained increased attention by the researches [34–40]. The individual components of the EOs clearly had antibacterial properties, although the mechanism is poorly understood. Therefore, the effect of EOs used in our study on biofilm formation of the two *Haemophilus* species was also investigated. Some previous studies from the literature have already described that cinnamon oil inhibited the biofilm of following pathogens as well, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, and *S. aureus* [41–44] reported the inhibitory effect of menthol, menthone, pulegone, 1,8-cineole, terpinen-4-ol against the biofilm formation of *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*. Clove and thyme oil also showed strong anti-biofilm activity against several Gram-positive (e.g., *S. aureus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *L. innocua*) and Gram-negative (e.g., *C. jejuni*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. enteritidis*) pathogens as well [45–50]. The biofilm inhibition of *Haemophilus* species has been only screened with synthetic products: Cefotaxime [51], 1,2,4-triazole-ciprofloxacin [52], garenoxacin [53]. The effect of cinnamon, thyme, clove and peppermint oil against *Haemophilus* species has not been tested earlier.

In the pharmaceutical technology, the formulation of the products and the water solubility of the active ingredients are highly important. In our previous experiment, three different formulations of EOs were prepared used absolute ethanol, Tween80, and Pickering nano-emulsion. Among the EOs, thyme and cinnamon produced the highest inhibitory rates and their Pickering nano-emulsions were the most effective formula [24]. This study showed that the nanotechnological formulated samples had pronounced anti-biofilm effect compared to the non-formulated EOs samples. The samples with absolute ethanol and Tween80 surfactant resulted that the biomass of *Haemophilus* biofilm decreased by half, but using the Pickering-emulsions the biomass of biofilm decreased to one third. Using Tween80 surfactant, it is discernible the decrease of biomass compared to the BHI control. In this case, we cannot exclude the antibacterial effect of the surfactant. The absolute ethanol itself has not strong antibacterial effect, but the EO samples with absolute ethanol resulted in the least biomass reduction.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Essential Oils and Their Components

The EO of clove (Batch number: H7352/1602), cinnamon bark (Batch number: I3201/1609), peppermint (Batch number: H7101/1601), and thyme (Batch number: H3981/1509) were obtained from a Hungarian company (AROMAX Zrt., Budapest, Hungary). Their chemical composition was determined by GC-MS. The main components of the EOs (eugenol, *trans*-cinnamaldehyde, menthol and thymol) were bought from Sigma-Aldrich (Budapest, Hungary).

### 4.2. GC-FID and GC-MS

One microliter of EO samples, diluted in ethanol (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), was injected in split mode, the injector temperature was 250  $^{\circ}\text{C}$ , and the split ratio was 1:50. The analyses were carried out with an Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) system equipped with an Agilent SLB-5MS capillary column (30 m  $\times$  250  $\mu\text{m}$   $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ). The GC oven temperature was increased at a rate of 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  from 60  $^{\circ}\text{C}$  (3 min isothermal) to 250  $^{\circ}\text{C}$ , with a final isotherm at 250  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min. High purity helium was used as carrier gas at 1.0 mL/min (37 cm/s) in constant flow mode. The mass selective detector (MSD) was equipped with a quadrupole mass analyser and was operated in electron ionization mode at 70 eV in full scan mode (41–500 amu at 3.2 scan/s). The data were evaluated using MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent). The identification of the compounds was carried out by comparing retention times, linear retention indexes, and recorded spectra with the data of authentic standards, and the NIST 2.0 library was also used. The GC-FID were made using a Fisons GC 8000 gas chromatograph (Carlo Erba, Italy). An Rt- $\beta$ -DEXm (Restek) capillary column, 30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, was used. The carrier gas was nitrogen at 6.8 mL/min flow rate. A 0.2 mL volume of a 0.1% solution of the oil was injected (1 mL EO in 1 mL chloroform). The splitless injection was carried out. The temperatures of the injector and detector were 210  $^{\circ}\text{C}$  and 240  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. The oven temperature was increased at a rate of 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  from 60  $^{\circ}\text{C}$  to 230  $^{\circ}\text{C}$ , with a final isotherm at 230  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min. Identification of peaks was made by retention data compared with data obtained by GC-MS and data of standards (Fluka Analytical and Sigma-Aldrich); percentage evaluation was carried out by area normalization. Three parallel measurements were made; RSD percentages were below 4.5%.

To identify the microbiologically active compounds in the separated EOs during TLC-DB, 150  $\mu\text{L}$  of EO was applied onto the TLC layer as 150 mm band, and after the development, the zones of active compounds were scraped off and eluted with 0.5 mL of ethanol for GC-MS.

### 4.3. TLC-DB

#### 4.3.1. Cultivation of Test Bacteria for Dipping

The antibacterial effect of EOs and their main components was screened on *Haemophilus influenzae* (DSM 4690) and *H. parainfluenzae* (DSM 8978) in the laboratory of the Department of Medical Microbiology and Immunology (Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary). For bioautographic assay, bacteria were grown in 100 mL Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Sigma Aldrich Ltd., Darmstadt, Germany) with 1 mL supplement B (Diagon Kft., Budapest, Hungary) and 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NAD solution (1 mg/mL) at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a shaker incubator at a speed of 60 rpm for 24 h [54]. The bacterial suspension was diluted with fresh nutrient broth to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.4, which corresponds to approximately  $4 \times 10^7$  colony-forming units (cfu) mL.

#### 4.3.2. Layer Chromatography

We investigated the antibacterial effect of EOs without TLC separation and the antibacterial effect of their components after TLC separation [22]. Chromatography was performed on 5  $\times$  10 cm silica gel 60 F<sub>254</sub> aluminum sheet TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). EOs were dissolved in absolute

ethanol to give solutions containing 100  $\mu\text{L}$  oil in 500  $\mu\text{L}$  absolute ethanol, and 1.0  $\mu\text{L}$  was applied to the TLC plate with Finnpiquette pipettes (Merck, Darmstadt, Germany). Absolute ethanol was the solvent control and amikacin (Likacin 250 mg/mL, Lisapharma S.p.A.) as a positive control. 0.2  $\mu\text{L}$  from the positive control (amikacin) and 1.0  $\mu\text{L}$  from the negative control (absolute ethanol) have been applied to the TLC plate. After separation with the mobile phase, the antibacterial activity of the main EO components (thymol, menthol, trans-cinnamaldehyde, and eugenol) was also investigated by TLC-DB. The main components were dissolved in absolute ethanol to give solutions containing 20 mg/mL. From the stock solutions, 0.2  $\mu\text{L}$  (0.004 mg) were applied to the plates. From the previously mentioned EO solutions, 1.0  $\mu\text{L}$  was used. The position of the starting line was 1.5 cm from the bottom and 1.5 cm from the left side. The standards were applied to the TLC plates next to the spots of the oils. After sample application, the plates were developed with the previously optimized mobile phase. For the separation of EOs, toluene:ethyl acetate (95:5) and dichloromethane (in the case of cinnamon bark oil) was recommended as the mobile phase [24]. Ascendant development chromatography was used, in a saturated twin trough chamber (Camag, Muttenz, Switzerland). All TLC separations were performed at room temperature (20 °C). After chromatographic separation, the absorbent layers were dried at 90 °C, for 5 min to remove the solvent completely. Ethanolic vanillin–sulfuric acid reagent [24] was used to visualize the separated compounds. Detection of the separated compounds was performed on R<sub>f</sub> value and color of the standards. Evaluation of the separated compounds was also performed under UV light at 254 nm. It should be noted that the TLC plates for bioautography were not treated with ethanolic vanillin–sulfuric acid reagent, because this step interferes with the microbiological steps of TLC-DB.

#### 4.3.3. Post-Chromatographic Detection

After layer chromatography, the TLC plates were treated with the suspension of *H. influenzae* and *H. parainfluenzae*, respectively. Layers were dipped into a 100 mL of bacterial suspension to assure a homogenous distribution and adhesion of bacteria onto the surface of the layers. After immersion, the layers were transferred into a low-wall horizontal chamber (chamber dimension: 20 × 14.5 × 5 cm) and incubated for 2 h at 37 °C. Thereafter for visualization of antibacterial spots, TLC plates were immersed into the aqueous solution of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 0.05 g/85 mL) (Sigma Aldrich Ltd., Darmstadt, Germany), for 5 s, and then incubated at 37 °C for 24 h. On the TLC plate, metabolically active bacteria convert the tetrazolium salt, MTT, into formazan dye. White spots (as inhibition zones) against the bluish-violet background indicated the lack of dehydrogenase activity, due to the antibacterial activity of the tested EO or their main compounds. The inhibitory zones (expressed in cm) of EOs without separation were measured with Motic Images Plus 2.0 program (ver. 2.0., Motic, Hong Kong, China).

#### 4.4. Statistical Analyses

Statistical analyses were made in R, version 3.1.2 [55]. The measured diameters were analyzed with linear model [56] using the function `lm`. In our model, the explanatory variables (bacterial species, EO and quantity of EOs), treated as fixed factors. No data transformation was made. Checking the need for transformation was based on graphical evaluation, according to Crawley [57]. For pair-wise comparisons, Tukey post-hoc tests were conducted in with `multcomp`-package [58] to compare the difference among all experimental set-ups.

#### 4.5. Biofilm Inhibition Experiments

##### 4.5.1. Broth Macrodilution Test (BDT)

During biofilm inhibition experiments minimum inhibitory concentration/2 (MIC/2) values of the EOs were used. The MICs were determined with broth macrodilution test (BDT) based on Ács et al. [14].

#### 4.5.2. Preparation of Pickering Emulsion of the EOs

Because of the volatility and non-water soluble characters of EOs, we wanted to make the water-soluble formulation of our EO samples, and eliminate such kind of solvents, e.g., dimethyl sulfoxide (DMSO), from the assay which can generally be used in the microbiological assays, but may influence the results.

For the synthesis and surface modification of silica nanoparticles tetraethoxysilane [TEOS], (Alfa Aesar, [Haverhill, MA, USA], purity 98%), ethyltriethoxysilane [ETES] (Alfa Aesar [USA], purity 96%), absolute ethanol (VWR Chemicals [Budapest, Hungary], AnalaR Normapur, purity  $\geq 99.8\%$ ), 28 *w/w*% ammonium solution (VWR Chemicals [Hungary], AnalaR Normapur, analytical reagent) were used. The stabilizing agent of Pickering emulsions was nanoparticle suspensions, of conventional emulsions was Tween<sup>®</sup>80 (Polysorbate80, Acros Organics, Princeton, NJ, USA).

#### Synthesis, Surface Modification and Characterization of Silica Nanoparticles

Synthesis of hydrophilic silica was based on the work of Stöber, Fink and Bohn [59]. Previously, we performed the optimization of size-controlled silica nanoparticle synthesis process and their surface modification with ETES. Furthermore, the nanoparticle characterization was also completed. The details can be read in our paper [25].

#### Preparation and Characterization of O/W (Oil/Water) Type EOs Emulsions

For the preparation of conventional, surfactant stabilized the emulsion, Tween80 non-ionic surfactant was used, because this chemical is widely used in microbiological experiments and protocols, for solubilizing the non-water soluble, lipophilic molecules, e.g., EOs. We have used 20ET nanoparticles [51] as stabilizing agents for preparation of Pickering emulsions. The concentration of emulsion stabilizing agents was 1 mg/mL in all cases. The mixture of EO, Tween80/silica nanoparticle suspension and water is sonicated for 2 min (Bandelin Sonorex RK 52H, Berlin, Germany) in the pre-emulsification process. The final emulsification was performed with UltraTurrax (IKA Werke T-25 Basic, Staufen, Germany) for 2 min at 13,500 rpm. Each sample was made in triplicates. The emulsion droplet size was determined with dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer Nano S instrument (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, United Kingdom). The stability of emulsions was examined with periodical droplet size measurement. The emulsions were stored at room temperature ( $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in dark bottles. The EO concentrations were the MIC/2 values against *H. influenzae* and *H. parainfluenzae*.

#### 4.5.3. Anti-Biofilm Activity Test

The biofilms were prepared in 96-well microtiter plate. 200  $\mu\text{L}$  of bacterial culture ( $4 \times 10^7$  cells/mL) was added into each well; then, the microtiter plate was incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 4 h in order to help the adhesion of the cells. After the incubation time the non-adherent cells were washed with physiological saline solution. The absolute ethanol, Tween 80 surfactant (1%) and Pickering nano-emulsions of the EOs were used for the experiments. In the experiment, untreated samples were applied, when only BHI medium was added to the bacterial culture. As detergent control, we used Tween80 (1%), 20ET Pickering nanoparticles (1 mg/mL), and as solvent control, absolute ethanol was also prepared. After the treatments, the microtiter plate was incubated again at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Then the adherent cells were fixed with methanol for 15 min. The biofilms were dyed with 0.1% crystal violet solution for 20 min. The redundant dye was removed. 33 *w/w*% of acetic acid was added to each well. Then the absorbance was measured at  $\lambda = 595\text{ nm}$  with a microtiter plate reader (BMG Labtech SPECTROstar Nano, Budapest, Hungary). All tests were carried out in six times [60].

## 5. Conclusions

Overall, we can say that the nanotechnological formulation of EOs seem to be a promising solution in anti-biofilm tests, because the Pickering-emulsion without EO has not antibacterial effect, but the Pickering-emulsion with EO resulted decreasing of the biofilm biomass. Cinnamon, thyme, and clove oils in Pickering emulsion showed not only anti-*Haemophilus* activity, but inhibited the biofilm formation in contrast with conventional, surfactant stabilized emulsion or absolute ethanol. We suppose that the enhanced biofilm inhibition properties of the Pickering nano-emulsion of EOs may be attributed to the adsorption of silica nanoparticles on the surface and pores of agar membrane or biofilm. It can be concluded that O/W type Pickering nano-emulsions form of thyme, cinnamon, and clove oils provide a new possibility for the application of EOs in pharmaceutical treatment against *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae* caused respiratory tract diseases.

Furthermore, we conclude that TLC-DB is an appropriate assay for detecting the anti-*Haemophilus* activity of non-water soluble extracts with complex composition, e.g., EOs. According to our results, the EO of cinnamon bark, thyme, and clove are promising antibacterial agents against *H. influenzae*, and *H. parainfluenzae* and their biofilm inhibitory capacity may be included in the mode of antibacterial action. Their water soluble Pickering nano-emulsions showed the highest inhibitory rate in the anti-biofilm test; therefore, this formulation may be regarded as relevant preparation for further biological experiments, including scanning electron microscopic and cell line studies.

**Author Contributions:** Conceptualization, G.H., B.K. and A.S., V.L.B., K.A.; methodology, V.L.B., B.H., E.K., A.V., A.B.; Software, D.U.N., V.L.B.; Validation, G.H., J.K. and B.K.; Formal analysis, V.L.B., K.Á., G.H.; Investigation, V.L.B., B.H., A.V.; Resources, G.H., B.K.; Data curation, B.H., D.U.N., V.L.B.; Writing—original draft preparation, V.L.B., K.Á., G.H.; Writing—review and editing, G.H.; Visualization, D.U.N., V.L.B.; Supervision, G.H., J.K., A.S.; Project administration, G.H.; Funding acquisition, G.H.

**Funding:** This work was supported by the NKFI (National Research, Development and Innovation Office) 18 K 128217 grant of Györgyi Horváth and EFOP 3.6.1-16-2016-00004 project (Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Van Welie, R.T.H. *Alle Cosmetica Ingredienten En Hun Functies*; Nederlandse Cosmetica Vereniging: Zeist, The Netherlands, 1997; Volume 126.
2. Bauer, K.; Garbe, D. Common fragrance and flavor materials. In *Preparation, Properties and Uses*; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, Germany, 1985; Volume 213.
3. Lober, B. Update in infectious diseases. *Ann. Intern. Med.* **2006**, *145*, 354–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Eloff, J.N. A proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts—A small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care. *S. Afr. J. Sci.* **2000**, *96*, 116–118.
5. Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Jones, F.A. Herbs—Useful plants. Their role in history and today. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **1996**, *8*, 1227–1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Botz, L.; Nagy, S.; Kocsis, B. Detection of microbiologically active compounds. In *Planar Chromatography, A Retrospective View for the Third Millennium*; Nyiredy, S., Ed.; Springer: Budapest, Hungary, 2001; pp. 489–516.
8. Lund, B.M.; Lyon, G.D. Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. herbicola* on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.* **1975**, *110*, 193–196. [[CrossRef](#)]
9. Horváth, G.; Botz, L.; Kocsis, B.; Lemberkovics, É.; Szabó, L.G. Antimicrobial natural products and antibiotics detected by direct bioautography using plant pathogenic bacteria. *Acta Bot. Hung.* **2004**, *46*, 153–165. [[CrossRef](#)]
10. Quiroga, E.N.; Sampietro, D.A.; Sgariglia, M.A.; Soberón, J.R.; Vattuone, M.A. Antimycotic activity of 5'-prenylisoflavanones of the plant *Geoffroea decorticans*, against *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 42–46. [[CrossRef](#)]



11. Fabio, A.; Cermelli, C.; Fabio, G.; Nicoletti, P.; Quaglio, P. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 374–377. [[CrossRef](#)]
12. Inouye, S.; Yamaguchi, H.; Takizawa, T. Screening of antibacterial effect of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. Infect. Chemother.* **2001**, *7*, 251–254. [[CrossRef](#)]
13. World Health Organization: Ten Leading Causes of Death. Available online: <http://apps.who.int/gho/data/view.wrapper.MGHEMORTCAUSE10-2012?lang=en> (accessed on 3 September 2014).
14. Ács, K.; Balázs, V.L.; Kocsis, B.; Bencsik, T.; Böszörményi, A.; Horváth, G. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 227. [[CrossRef](#)]
15. Ács, K.; Bencsik, T.; Böszörményi, A.; Kocsis, B.; Horváth, G. Essential oils and their vapors as potential antibacterial agents against respiratory tract pathogens. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1709–1712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Flemming, H.C.; Neu, T.R.; Wozniak, D.J. The EPS matrix: The “house of biofilm cells”. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7945–7947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hall-Stoodley, L.; Hu, F.Z.; Gieseke, A.; Nistico, L.; Nguyen, D.; Hayes, J.; Forbes, M.; Greenberg, D.P.; Dice, B.; Burrows, A.; et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* **2006**, *296*, 202–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ciofu, O.; Lykkesfeldt, J. Antioxidant supplementation for lung disease in cystic fibrosis—Review. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, *8*, 1–84.
19. Bryers, J.D. Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. LeBel, G.; Haas, B.; Adam, A.A.; Veilleux, M.P.; Lagha, A.B.; Grenier, D. Effect of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark essential oil on the halitosis-associated bacterium *Solobacterium moorei* and in vitro cytotoxicity. *Arch. Oral Biol.* **2017**, *83*, 97–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Vidács, A.; Kerekes, E.; Rajkó, R.; Petkovits, T.; Alharbi, N.S.; Khaled, J.M.; Vágvölgyi, C.; Krisch, J. Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. *J. Mol. Liq.* **2018**, *255*, 257–262. [[CrossRef](#)]
22. Jesionek, W.; Majer-Dziedzic, B.; Choma, M.I. TLC-Direct bioautography as a method for evaluation of antimicrobial properties of *Thymus vulgaris* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils of different origin. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2017**, *40*, 292–296. [[CrossRef](#)]
23. Wagner, H.; Bladt, S. Plant Drug Analysis. In *A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2001; pp. 150–161.
24. Horváth, B.; Szilárd, P.; Széchenyi, A. Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles. *Flavour Fragr. J.* **2018**, *33*, 1–12. [[CrossRef](#)]
25. Kerekes, E.B.; Deák, É.; Takó, M.; Tserennadmid, R.; Petkovits, T.; Vágvölgyi, C.; Krisch, J. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 933–942. [[PubMed](#)]
26. Yanwei, S.; Sijia, C.; Chen, Z.; Yali, L.; Li, M.; Xiangyu, Z. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **2018**, *87*, 235–241.
27. Hammer, K.; Carson, C.; Riley, T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 985–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kavanaugh, N.L.; Ribbec, K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 4057–4061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Saviuc, C.M.; Drumea, V.; Olariu, L.; Chifiriuc, M.C.; Bezirtzoglou, E.; Lazar, V. Essential oils with microbicidal and antibiofilm activity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2015**, *16*, 137–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Skocibusic, M.; Bezic, N.; Dunkic, V.; Radonic, A. Antibacterial activity of *Achillea clavennae* essential oils on respiratory tract pathogens. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 733–736. [[CrossRef](#)]
31. Viljoen, A.M.; Subramoney, S.; Van Vuuren, S.F.; Baser, K.H.C.; Demirci, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 271–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Lopez-Romero, J.; Gonza'lez-Rios, H.; Borges, A.; Simoes, M. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*, 795435. [[CrossRef](#)]
33. Houdkova, M.; Rondevaldova, J.; Duskocil, I.; Kokoska, L. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia* **2017**, *118*, 56–62. [[CrossRef](#)]
34. Derakhshan, S.; Sattari, M.; Bigdeli, M. Effect of cumin (*Cuminum cyminum*) seed essential oil on biofilm formation and plasmid integrity of *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacogn. Mag.* **2010**, *6*, 57–61.
35. Lang, G.; Buchbauer, G. A review on recent research (2008–2010) on essential as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* **2011**, *27*, 13–39. [[CrossRef](#)]
36. Khan, S.T.; Khan, M.; Ahmad, J.; Wahab, R.; Abd-Elkader, O.H.; Musarrat, J. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express* **2017**, *7*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. De Paula, S.B.; Bartelli, T.F.; Di Raimo, V.; Santos, J.P.; Morey, A.T.; Bosini, M.A. Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2014**, *2014*, 505204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mathur, S.; Udgire, M.; Khambhupati, A.; Paul, D. Anti-biofilm activity and bioactive component analysis of eucalyptus oil against urinary tract pathogen. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, *3*, 912–918.
39. Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Kim, S.I.; Baek, K.H.; Lee, J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *195*, 30–39. [[CrossRef](#)]
40. Almeida, L.F.; Paula, J.F.; Almeida, R.V.; Williams, D.W.; Hebling, J.; Cavalcanti, Y.W. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontol. Scand.* **2016**, *74*, 393–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Gupta, C.; Garg, A.P.; Uniyal, R.C.; Kumari, A. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2008**, *2*, 247–251.
42. Zhang, Y.; Liu, X.; Wang, Y.; Jiang, P.; Quek, S.Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* **2016**, *59*, 282–289. [[CrossRef](#)]
43. Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2474–2478. [[CrossRef](#)]
44. Hafedh, H.; Fethi, B.A.; Mejdi, S.; Emira, N.; Bakhrouf Amin, B. Effect of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2010**, *4*, 1122–1127.
45. Latifah-Munirah, B.; Himratul-Aznita, W.H.; Zain, N.M. Eugenol, an essential oil of clove, causes disruption to the cell wall of *Candida albicans* (ATCC 14053). *Front. Life Sci.* **2015**, *8*, 231–240. [[CrossRef](#)]
46. Yadav, M.K.; Chae, S.W.; Im, G.J.; Chung, J.W.; Song, J.J. Eugenol: A phytochemical effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Liu, Q.; Meng, X.; Li, Y.; Zhao, C.N.; Tang, G.Y.; Li, H.B. Antibacterial and antifungal activities of spices. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sambyal, S.S.; Sharma, P.; Shrivastava, D. Antibiofilm activity of selected plant essential oils against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 444–450. [[CrossRef](#)]
49. Rasooli, I.; Rezaei, M.B.; Allameli, A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.* **2006**, *10*, 236–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Huma, J.; Firoz, A.A.; Iqbal, A. CHAPTER 9 Prospects of Essential Oils in Controlling Pathogenic Biofilm. In *New Look to Phytomedicine Advancements in Herbal Products as Novel Drug Leads*; Academic Press: Cambridge, CA, USA, 2019; pp. 203–236.
51. Baothong, S.; Sitthisak, S.; Kunthalert, D. In vitro interference of cefotaxime at subinhibitory concentrations on biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *6*, 745–750. [[CrossRef](#)]

52. Kosikowska, U.; Andrzejczuk, S.; Plech, T.; Malm, A. Inhibitory effect of 1,2,4-triazole-ciprofloxacin hybrids on *Haemophilus parainfluenzae* and *Haemophilus influenzae* biofilm formation in vitro under stationary conditions. *Res. Microbiol.* **2016**, *167*, 647–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Takahata, M.; Sugiura, Y.; Shinmura, Y.; Fukuda, Y.; Nomura, N. Bactericidal activity of garenoxacin against in vitro biofilm formed by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Chemother.* **2013**, *19*, 441–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hindler, J.A.; Jorgensen, J.H. Susceptibility test methods: Fastidious bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed.; ASM: Washington, DC, USA, 2011; pp. 1180–1187.
55. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2014.
56. Chambers, J.M. Linear models. In *Chapter 4 of Statistical Models*; Chambers, J.M., Hastie, T.J., Eds.; Wadsworth & Brooks/Cole: Pacific Grove, CA, USA, 1992.
57. Crawley, M.J. *Statistics: An Introduction Using R*, 2nd ed.; John Wiley and Sons: Chichester, UK, 2014.
58. Hothorn, T.; Bretz, F.; Westfall, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biom. J.* **2008**, *50*, 346–363. [[CrossRef](#)]
59. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled growth of monodispersed silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69. [[CrossRef](#)]
60. Peeters, E.; Nelis, H.J.; Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microliter plates. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *72*, 157–165. [[CrossRef](#)]

**Sample Availability:** Samples of the compounds cinnamaldehyde, eugenol, menthone, thymol are available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



OPEN

# Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment

Barbara Horváth<sup>1,5</sup>, Viktória L. Balázs<sup>2,5</sup>, Adorján Varga<sup>3</sup>, Andrea Böszörményi<sup>4</sup>, Béla Kocsis<sup>3</sup>, Györgyi Horváth<sup>2</sup> & Aleksandar Széchenyi<sup>1\*</sup>

Essential oils (EOs) are commonly applied in mouth care products like mouthwashes, mostly as an ethanolic solution or by usage of surfactants as solubilising agents. In this study, we present a formulation for preparation of Pickering nano-emulsions (PnE) of EOs as a novel form for application of EOs in mouth care. For the preparation of PnE, we have synthesised surface-modified silica nanoparticles with a mean diameter of 20 nm, as well as we have examined the effect of EOs concentration on PnE droplet size and stability. *In vitro* study of their effect on the *Streptococcus mutans* biofilm as the main pathogen of dental health problems has been performed. We have found that EOs in the PnE form has the highest effectiveness against biofilm formation. Diffusion through the biofilm model membrane was studied to explain this observation. We have found that PnEs have a better performance in the transportation of EOs through model membrane than the ethanolic solutions and conventional emulsions (CEs).

Dental plaque is a thin biofilm layer built by microorganisms, mainly *Streptococcus* species<sup>1</sup>. Microbial activity in the dental plaque causes a local decrease of pH value and weakens the mineralised tooth structures that can lead to several tooth diseases like caries, gingivitis, and periodontitis. For this reason, the removal of dental plaque is the most important part of mouth hygiene. The daily removal is commonly achieved by mechanical methods, such as tooth brushing, usage of tooth floss or interdental brushing<sup>2</sup>. Tooth brushing is used by most of the population, while only a small percentage uses tooth floss or interdental brushing regularly<sup>3</sup>. The efficacy of mechanical methods differs in a great extent. The plaque removal by tooth brushing mainly depends on the time and technique of brushing, and on the quality of toothbrushes<sup>4</sup>, but usually, the desired plaque removal is not reached by this method. That is why an additional technique, such as chemical plaque removal or prevention, is often used. Chemical plaque removal or prevention can be achieved by application of mouthwashes, whose usage is widespread among the grown population. The commercially available mouthwashes usually contain amine-fluoridine, chlorhexidine, hexetidine, octenidine, triclosan or plant extracts as antibacterial agents<sup>5</sup>. Most of them cause some side effect after prolonged usage, except plant extracts like EOs. G. Pizzo *et al.* demonstrated that EOs have the same efficacy as aminefluoridin or CHX so that they can replace these ingredients in mouthwashes<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Rókus str. 2., H-7624, Pécs, Hungary. <sup>2</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Rókus str. 2., H-7624, Pécs, Hungary. <sup>3</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Szigeti str. 12, H-7624, Pécs, Hungary. <sup>4</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy Semmelweis University, Üllői str. 26, H-1085, Budapest, Hungary. <sup>5</sup>These authors contributed equally: Barbara Horváth and Viktória L. Balázs. \*email: [szealex@gammat.ttk.pte.hu](mailto:szealex@gammat.ttk.pte.hu)

The EOs based commercial products that are used for treatment or prevention of dental diseases are containing surfactants, solvents or co-solvents to enhance the water solubility of EOs<sup>7</sup>. Among the solvents, different alcohols (e.g. ethanol, propylene glycol, glycerine) are applied in mouthwash or gargles. Commonly used surfactants are polysorbates (20, 60 or 80)<sup>8</sup> and SLS (Na-lauryl-sulphate)<sup>9</sup>, which are used as emulsion stabilisers or EO solubilising agents. Unfortunately, the surfactants can cause mucous membrane irritation by damaging their cell membranes; additionally, at long-term usage, they can get into the blood circulation and cause other side effects<sup>10</sup>. The alcohols can cause dehydration of the mouth, which makes the mucous membrane more sensitive to infections or other diseases<sup>11</sup>.

Additionally, the application of solvents and surfactants in microbiological tests can lead to misinterpretation of the experimental data, because alcohols and surfactants also have antimicrobial activity<sup>12</sup> that is why the effect of essential oils cannot be unambiguously determined. To avoid the use of solvents and surfactants, yet to provide the availability of EOs on the test or treatment site, Pickering emulsions can be prepared, which are emulsions stabilised with solid particles<sup>13</sup>. For this purpose, we can use biologically inert, non-toxic particles, e.g. cellulose<sup>14</sup>, silica<sup>15</sup> or PLGA<sup>16</sup> particles, which are widely used in pharmaceutical technology.

Pickering emulsions can have the same or better stability than the conventional, surfactant stabilised emulsions interface<sup>17</sup>. The adsorption of the solid particles and surfactants on the liquid-liquid interface is a spontaneous, reversible process. The adsorption energy of solid particles on the liquid-liquid interface is higher than the adsorption energy of surfactants. In some cases, where the adsorption energy of solid particles is extremely high, adsorption process can be considered as irreversible<sup>17</sup>. Because of their stability, Pickering emulsions can be used in pharmaceutical and medical applications.

Beside emulsion stabilisation, the solid particles may interact with biofilm, and targeted EO transportation can also be achieved<sup>18</sup>. The effectiveness of targeted EO delivery depends on the emulsion type, the emulsion stabilisation agent and emulsion droplet size<sup>19,20</sup>. Usually, the biofilm consists of polysaccharide matrix, and it is impermeable for many pharmaceutically active ingredients, that is why the treatment of stiff bacterial colonies is challenging<sup>21</sup>. Because of the hydrophilic properties of *Streptococcus mutans* biofilm<sup>22</sup>, an O/W type emulsion should be applied. When the emulsion is stabilised by the particles with appropriate hydrophilic/lipophilic surface character, which can adsorbed preferably on the biofilm, targeted delivery can be reached. The emulsion droplet size also plays an important role in the delivery of EOs: the mean pore size of biofilms in the top layer ranges from approximately 1.7–2.7  $\mu\text{m}$  and 0.3–0.4  $\mu\text{m}$  in the bottom layers<sup>23</sup>. Because of the pore size of biofilms we can assume, that if the emulsion droplet size is less than 300 nm, the droplets can penetrate deep into the biofilm matrix.

We aimed to prepare O/W type Pickering emulsions with four EOs, such as cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl.), clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry), peppermint (*Mentha x piperita* L.) and thyme EO (*Thymus vulgaris* L.) and to examine the influence of the EOs concentration on droplet size and stability of Pickering emulsions. Their antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* have been studied before<sup>24</sup>, moreover several researchers have found that these EOs can act as biofilm inhibitors with other bacterial strains<sup>25–28</sup>. Their ethanolic solutions and conventional emulsions (CEs) have also been tested to compare the effectiveness of different EO delivery forms.

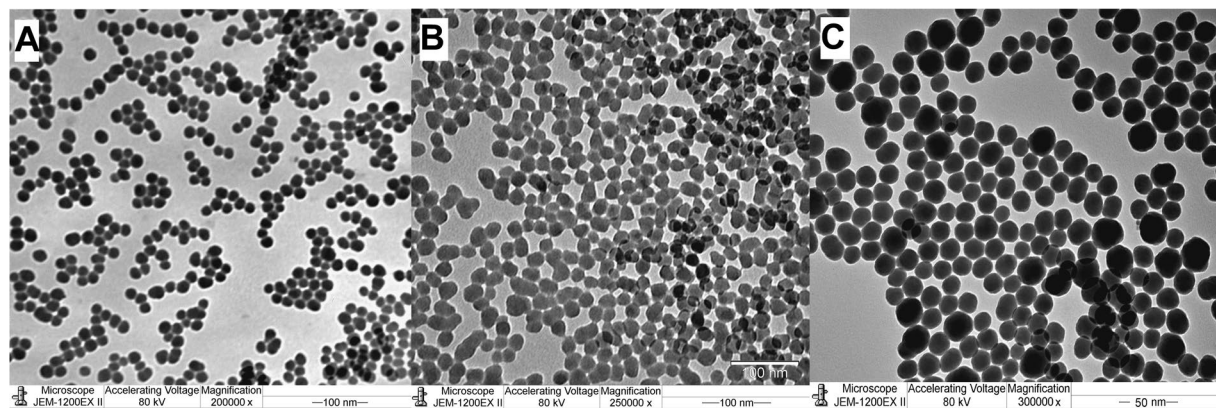
We have also examined the diffusion properties of different EO forms through model membrane, to explain the difference in their antibacterial or inhibitory effects. In the case of cinnamon EO we have prepared and examined PnE with SNPs that have different hydrophilic/lipophilic surface character to determine its influence on the antibacterial activity and diffusion properties as model membrane agar gel was used, which is a suitable *Streptococcus mutans* biofilm model because they have similar hydrophilic properties and tortuous pore structure<sup>29</sup>.

## Results and Discussion

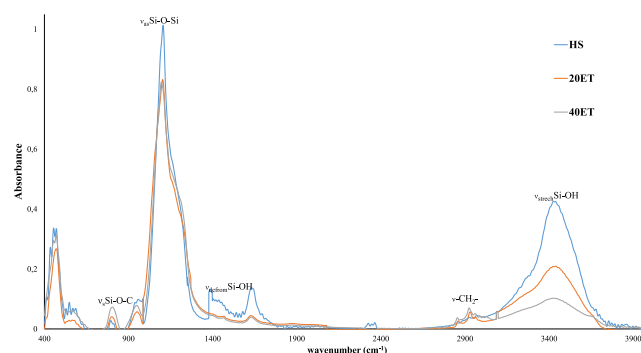
**Synthesis and characterisation of silica nanoparticles.** Hydrophilic silica nanoparticles (HS) were synthesised by a method established by Stöber, Fink and Bohn, the mean diameter was 20 nm, and the PDI was 0.008, determined by DLS. The stability of the PnEs can be influenced by the hydrophilic/lipophilic surface properties of silica nanoparticles<sup>30</sup>. In our previous work<sup>31</sup>, we have ascertained that the PnEs with appropriate stability and tailored size can be prepared with silica nanoparticles, which were partially surface modified with ethyl groups. For this reason, we have modified the surface of HS by ethyl functional groups with a theoretical surface coverage of 20% (20ET) and 40% (40ET).

The TEM examinations showed that the mean diameter of silica samples was mean 20 nm; they are highly monodispersed, nearly spherical and have a smooth surface (see Fig. 1). In the case of HS high negative zeta potential is expected, and the measurements confirm it. High number of free silanol groups at the surface causes the negative zeta potential, as their pK value is approximately 4.5, which means that some of them are dissociated in the water suspension. The surface modification will decrease the number of free silanol groups on the surface, which should cause the decrease of the zeta potential under the same conditions. The zeta potential of HS suspended in water was  $\zeta = -116$  mV. After surface modification the zeta potential values decreased with increasing surface coverage. The values were  $\zeta = -79$  mV for 20ET and  $\zeta = -63$  mV for 40ET.

The surface modification of SNPs was examined with FT IR spectroscopy. No significant difference in the position of the vibrational frequency for the SiO<sub>2</sub> functional groups was observed (see Fig. 2). The surface modification of HS with ethyl functional groups caused the decrease of the number of Si-OH groups on the surface of SNPs, hence intensity of peaks belonging to  $\nu_{\text{as}}\text{Si-O-Si}$  (1105 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_{\text{defrom}}\text{Si-OH}$  (1395 and 1645 cm<sup>-1</sup>) and  $\nu_{\text{stretch}}\text{Si-OH}$  (3095–3685 cm<sup>-1</sup>) decreased, while the intensity of peaks of  $\nu_{\text{s}}\text{Si-O-C}$  increased (815 cm<sup>-1</sup>). New peak attributed to the  $\nu\text{-CH}_2$  have appeared for the surface modified samples. Their vibrational frequencies are the same in both cases, 2855 and 2930 cm<sup>-1</sup>, but intensities are higher for the sample 40ET. The results clearly



**Figure 1.** TEM images of silica nanoparticles. (A) HS. (B) 20ET. (C) 40ET.



**Figure 2.** FT-IR spectra of silica nanoparticles.

show that the surface modification was successful, and the intensity of peaks  $\nu_{\text{s}}\text{Si-O-C}$  and  $\nu\text{-CH}_2$  correlate to the surface coverage with ethyl functional groups.

**GC-MS and GC-FID analysis of essential oils.** The exact composition of EOs was determined with gas chromatography. The components were identified by comparing their retention times and relative retention factors with standards and oils of known composition. Two parallel measurements have been performed. The main components are the follows eugenol 78.64% in clove EO, cinnamaldehyde 63.77% in cinnamon bark EO, menthol 50.4% and menthon 19.8% in peppermint EO, thymol 39.88% and p-cymene 19.2% in thyme EO. In Table 1. other major components can be seen. We did not indicate or identify the compounds which were present significantly under 1%; this is the reason why the totals are not 100%.

**Preparation and characterisation of pickering nano-emulsions.** The maximum concentration of EOs was set to MIC value for all examined emulsions. The MIC values of pure EOs in ethanolic solutions were previously determined against *Streptococcus mutans* with broth macrodilution test (see Part 3.4), for different EOs these were: clove EO 1.02 g/L, cinnamon EO 0.80 g/L, peppermint EO 1.96 g/L, thyme EO 0.40 g/L. We have prepared PnEs with HS, 20ET or 40ET stabilising agents, for CE's Tween80 surfactant was used, the concentrations of stabilising agents were 1 g/L for all experiments. The emulsions were stored at room temperature;  $t = 25^\circ\text{C}$ . Each experiment was made in triplicates. Stability of emulsions was determined from periodical droplet size determination with DLS (see Table 2.). The emulsions were considered to be stable when the droplet size did not change within 24 hours, and creaming, sedimentation or disproportionation did not occur. Because of the large number of experimental data, we did not indicate data for the standard deviations of droplet size in Table 2. All values were in 1.2–8.3% range.

Because the volume fraction of EO ( $\Theta_o$ ) was under 0.01 in every case, we could assume, that all PnEs and CE's were O/W type emulsions. We have performed filter paper tests with  $\text{CoCl}_2$  and dye test with Sudan red G to confirm this assumption<sup>29</sup>.

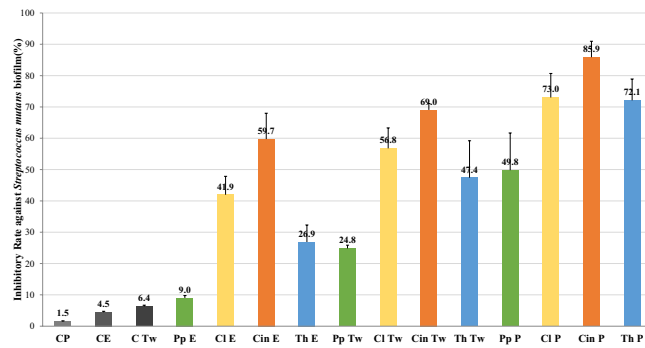
The results confirmed that the PnEs could have same or better stability than CE's (see Table 2), because of the high adsorption energy of solid nanoparticles on the liquid-liquid interface. The most stable emulsions are the thyme EO containing ones, in this case the stability of PnEs was 4 months, while its CE's were stable for only 1 month.

Results of GC measurements of essential oils					
Component	RI	Percentage of compounds (%)			
		Peppermint EO	Thyme EO	Clove EO	Cinnamon bark EO
$\alpha$ -Pinene	939	1.1	1.0	—	5.1
Camphene	951	—	2.0	—	-
$\beta$ -Myrcene	992	—	1.0	—	—
Carvacrol		—	5.9	—	—
$\alpha$ -Terpinene	1017	—	3.2	—	—
<i>p</i> -Cymene	1026	—	19.2	—	1.9
Limonene	1044	1.4	—	—	1.8
1,8-Cineole	1046	5.5	4.6	—	2.8
$\gamma$ -Terpinene	1060	—	6.7	—	—
Linalool	1104	—	5.6	—	4.0
Isopulegol	1150	1.0	—	—	—
Menthone	1156	19.8	—	—	—
Isomenthone	1159	7.0	—	—	—
Menthol	1172	50.4	—	—	—
Isomenthol	1183	4.3	—	—	—
$\alpha$ -Terpineol	1190	—	1.0	—	2.2
Pulegone	1215	1.9	—	—	—
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	1266	—	—	—	63.7
Bornyl acetate	1289	—	1.0	—	—
Thymol	1297	—	39.8	—	—
Isomenthyl acetate	1305	5.5	—	—	—
Eugenol	1373	—	—	78.8	4.6
$\beta$ -Elemene	1394	—	—	—	—
$\beta$ -Caryophyllene	1417	1.3	4.2	13.5	4.2
Cinnamyl acetate	1446	—	—	—	9.4
$\alpha$ -Humulene	1452	—	—	4.6	—
$\beta$ -Cadinene	1473	—	—	1.1	—
<b>Total:</b>		<b>99.2</b>	<b>98.2</b>	<b>98.0</b>	<b>99.7</b>

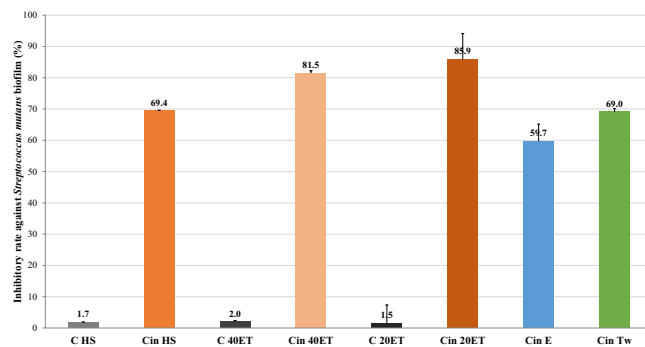
**Table 1.** Composition of essential oils. The results of GC analysis show the average per cent of the two parallel measurements of volatile compounds in every case. The values of standard deviation were below 4.5%. RI: retention indices relative to C8–C30 n-alkanes. We did not indicate the unknown compounds and compounds under 1%.

Parameters of Pickering- and conventional emulsions of essential oils				
Essential oil	$c_{oil}$ (g/L)	Stabilizing agent	$D_{droplet}$ (nm)	Stability
Clove EO	0.05–1.02	20ET	155–1660	2 weeks
	0.05–0.7	Tween80	155–245	2 weeks
	0.8–1.02	Tween80	335–455	1 weeks
Cinnamon EO	0.03–0.8	HS	400–4880	4 days
	0.03–0.8	20ET	185–280	2 months
	0.03–0.8	40ET	315–550	2 months
	0.03–0.5	Tween80	240–265	3 weeks
	0.6–0.8	Tween80	275–3010	2 weeks
Peppermint EO	0.11–1.96	20ET	210–11450	4 month
	0.105–0.7	Tween80	255–310	1 weeks
	0.8–1.96	Tween80	350–1090	2 weeks
Thyme EO	0.05–0.4	20ET	155–395	4 months
	0.05–0.4	Tween80	150–240	1 month

**Table 2.** Composition and characterisation of emulsions. Droplet size and stability were calculated from data of 3 parallel samples. The concentration of stabilizing agent was constant 1 g/L. Droplet size standard deviation =  $\pm 1.2$ –8.3%. All emulsions are O/W type, which was determined with conductivity tests.



**Figure 3.** Results of biofilm inhibition tests. Biofilm inhibition activity of different formulated EOs against *Streptococcus mutans*, the concentration of EOs were the MIC/2 values. C: control. P: PnE form. E: ethanol/ethanolic solution. Tw: Tween80 solution/CEs with Tween80 surfactant. Pp: peppermint EO, MIC/2: 0.98 g/L. Cl: clove EO, MIC/2: 0.51 g/L. Cin: cinnamon EO, MIC/2: 0.40 g/L. Th: thyme EO, MIC/2: 0.20 g/L.



**Figure 4.** Results of biofilm inhibition tests in case of cinnamon EO. Biofilm inhibition activity of different formulated cinnamon EO against *Streptococcus mutans*. The concentration of cinnamon EO was its MIC/2 values, 0.40 g/L. C: control. HS: PnE with HS stabilising agent. 20ET: PnE with 20ET stabilising agent. 40ET: PnE with 40ET stabilising agent. E: ethanol/ethanolic solution. Tw: CE with Tween80 surfactant.

**Biofilm formation and treatment.** The EOs concentration was MIC/2 value in all examined emulsions or solutions, which is a standard concentration for biofilm inhibition tests<sup>32</sup>. Our results of the crystal violet assay showed that the absolute ethanol and Tween80 solution have antibacterial effect, and they reduced the biofilm mass, while the HS, 20ET and 40ET nanoparticle suspensions had no antibacterial effect, and they did not reduce the biomass significantly.

Even so, the PnEs prepared with 20ET were the most effective forms in biofilm inhibition. For each EOs, the ethanolic solutions and CEs showed less biofilm inhibition (see Fig. 3.); e.g. in the case of thyme EO, the inhibitory rates (IR) were 26.9, 47.4 and 72.1% for ethanolic solution, CE and PnE respectively.

We have found cinnamon EO have the highest inhibition effect among tested EOs. The inhibitory rates for its different forms are 59.7 for ethanolic solution, 69.0% for CE and 85.9% for PnE respectively. In this case we have performed tests on the influence of the hydrophilic/lipophilic surface properties of stabilising SNPs on the inhibitory effect on PnE. HS and 40ET nanoparticles stabilised PnEs were also tested in biofilm inhibition. The results showed (Fig. 4), that in the case of 20ET nanoparticles stabilised PnE had better biofilm inhibition effect (IR 85.9%) than 40ET (IR 81.5%), and HS stabilised ones (IR 69.4%).

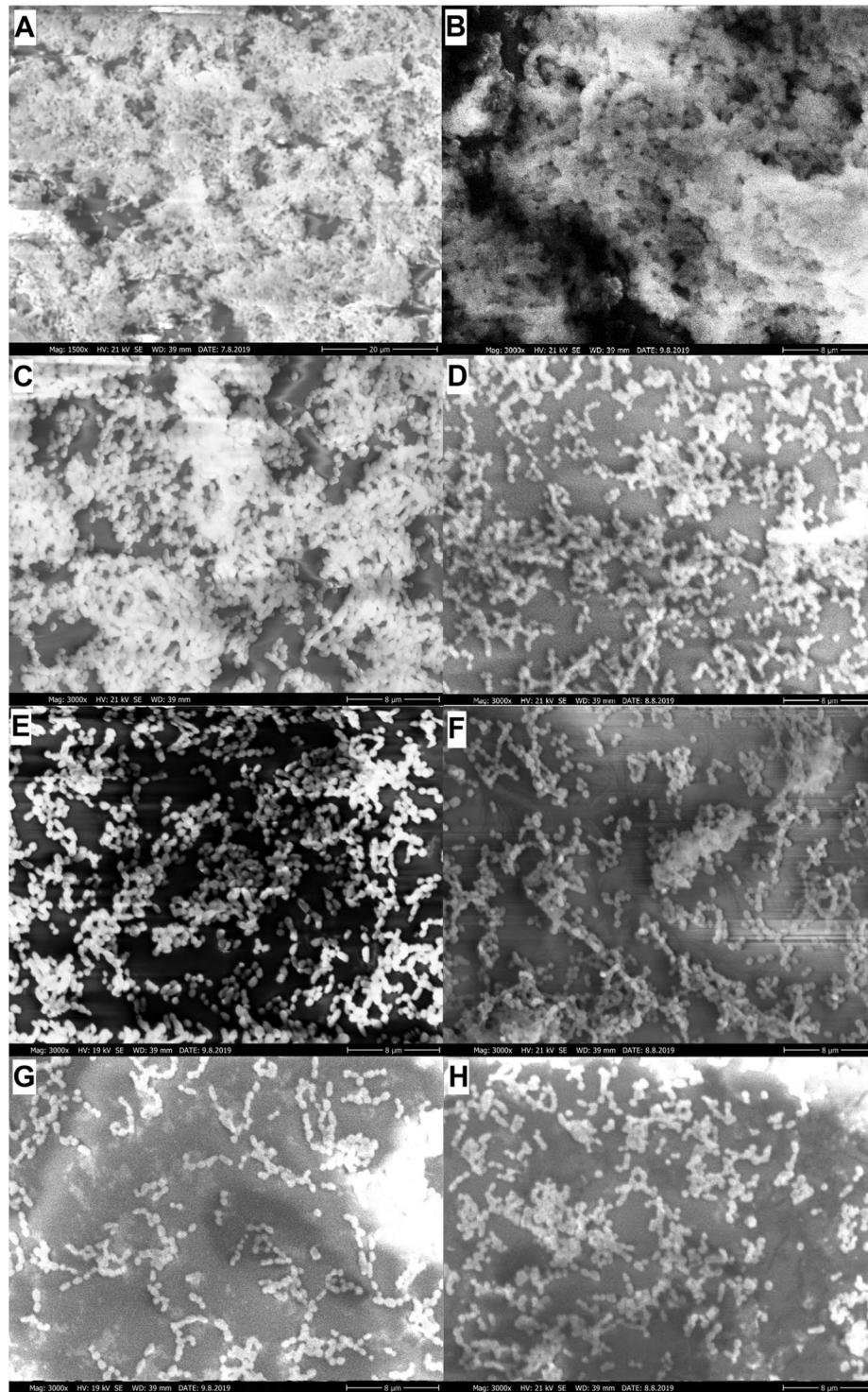
In Fig. 5 we can see the SEM images of untreated and treated biofilms. Figure 5A,B are the images of untreated control biofilms. The *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* colonies can be clearly seen, and thick coherent biofilm has formed on the surface. The SEM images bear out the results of biofilm inhibition experiments. The PnE of peppermint EO reduced the biofilm mass (Fig. 5C) minimally, while in the images of biofilms treated with PnE of clove (Fig. 5D) and thyme EO (Fig. 5E) we can see bacterial colonies on the surface, but the adherence of coherent biofilm was reduced.

The SEM images clearly show, high inhibitory effect of the PnEs of cinnamon EO. On the images of biofilms treated with HS (Fig. F) and 40ET (Fig. H) stabilized PnEs of cinnamon EO we can see some coherent biofilm spots, while on the image of biofilm treated with 20ET stabilized PnE of cinnamon EO (Fig. G), no coherent biofilm formation can be observed.

In all the cases, a very good correlation of the inhibitory rate obtained by the crystal violet assay and the data obtained from SEM images can be found.

**In vitro diffusion studies.** After the discussion on the results obtained from biofilm inhibition tests, an assumption has been made that there should be a correlation between inhibitory rate and diffusion properties



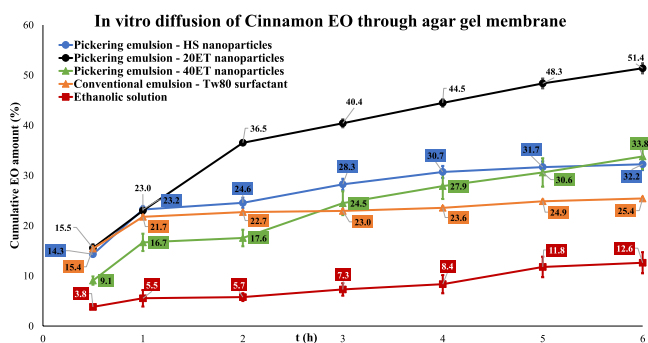


**Figure 5.** SEM images of biofilm and biofilms after treatment with a different formulation of cinnamon EO. The EO concentrations equal with the MIC/2. **(A,B)** Control *Streptococcus mutans* biofilm, untreated. **(C)** Biofilm treated with PnE of peppermint EO. **(D)** Biofilm treated with PnE of clove EO. **(E)** Biofilm treated with PnE of thyme EO. **(F)** Biofilm treated with HS stabilised PnE of cinnamon EO. **(G)** Biofilm treated with 20ET stabilised PnE of cinnamon EO. **(H)** Biofilm treated with 40ET stabilised PnE of cinnamon EO. The magnification is 1500x and 3000x for biofilm control, and 3000x for other samples, scale bar is 8 µm.

trough biofilm of the EOs in different forms. To confirm this assumption, *in vitro* diffusion tests were performed. Static Franz diffusion cell method was used with agar gel as model membrane. The EOs concentration was the same that was used for the biofilm inhibition tests, MIC/2 values. The droplet size of the different types of

Results of <i>in vitro</i> diffusion studies				
Essential oil	$c_{oil}$ g/l	Formula	Droplet size D (nm)	Cumulative EO release(%)
Clove	0.51	Ethanol solution	—	12.9 ± 2.8
		Conventional emulsion	320 ± 37	21.5 ± 0.1
		Pickering nano-emulsion	370 ± 22	27.5 ± 4.0
Cinnamon	0.40	Ethanol solution	—	10.5 ± 1.6
		Conventional emulsion	240 ± 20	30.7 ± 1.2
		Pickering nano-emulsion HS	220 ± 4	32.3 ± 1.2
		Pickering nano-emulsion 20ET	245 ± 12	51.4 ± 1.0
		Pickering nano-emulsion 40ET	255 ± 6	33.8 ± 2.5
Peppermint	0.98	Ethanol solution	—	69.7 ± 14.1
		Conventional emulsion	310 ± 9	69.0 ± 9.2
		Pickering nano-emulsion	210 ± 10	81.1 ± 2.2
Thyme	0.20	Ethanol solution	—	under LOD
		Conventional emulsion	245 ± 20	9.4 ± 0.4
		Pickering nano-emulsion	255 ± 5	18.9 ± 0.5

**Table 3.** Results of *in vitro* diffusion studies. The oil concentrations equal to MIC/2 values against *Streptococcus mutans*. Droplet sizes and cumulative EO releases were calculated from three parallel samples.



**Figure 6.** *In vitro* diffusion of cinnamon EO through agar gel membrane. The cinnamon EO concentration is 0.40 g/l (MIC/2 against *Streptococcus mutans*). The stabilising agent of PnEs are HS, 20ET, and 40ET nanoparticles, the stabilising agent of CE is Tween80. The concentration of emulsion stabilising agents is 1 g/l. The droplet size of CE is D = 320 nm, the PnE with HS D = 220, PnE with 20ET D = 245 nm, and PnE with 40ET D = 255.

emulsions was similar (see Table 3), and we could assume that the diffusion properties depend only on the type of the emulsion or surface properties of emulsion stabilising agent. The diffusion profiles of different EOs are very similar; this is why we have graphically presented only the *in vitro* diffusion study curve of cinnamon EO as it has shown the highest inhibitory rate (see Fig. 6). The results of cumulative amount after 6 hours for all samples can be seen in Table 3. The cumulative amount of EO means the diffused EO amount after 6 hours. The diffusion curves of all the other samples can be seen in Supplementary Information.

Generally, we can conclude that the cumulative EO amounts were highest for PnEs. In the case of cinnamon EO these values are: 51.4% for 20ET stabilised PnE, 30.7% for CE and 10.5% for ethanol solution respectively. At thyme EO, cumulative EO amount for ethanol solution was under the limit of detection value.

**Conclusions.** We have successfully prepared O/W type PnEs of EOs with droplet size tailored for diffusion through biofilm porous structure (210–370 nm). For the stabilisation of PnEs, we have synthesised and surface-modified spherical silica nanoparticles. These emulsions remained stable for at least 1 week, in some cases more, then 4 months.

We have determined MIC values against *Streptococcus mutans* for all examined EOs, and we have performed a biofilm inhibition tests applying EOs in MIC/2 amount. We have tested tree forms for all examined EOs, ethanol solution, CE and PnE. The test results shown that the PnE form has highest antimicrobial effectiveness compared to CE or ethanol solutions for all examined EOs. We assume that the difference in effect should correlate with the penetration of EOs in different form through polysaccharide biofilm structure. To confirm this idea we have studied the diffusion through model membrane (agar gel). The results have shown that for all samples, there is a direct relation of antimicrobial or inhibitory effect with diffusion properties of EOs in different form. The PnE form had the highest cumulative amount for all EOs, and ethanol solution had the lowest cumulative amount. This result is an explanation why the PnE have antibacterial effect while ethanol solution with the same EO concentration have inhibitory effect, which is clearly seen on the SEM images. The highest difference in the inhibitory

rate of different forms has been observed in the case of thyme oil. The thyme oil has the highest antimicrobial effectiveness in comparison with other examined EOs as its MIC value is lowest. The ethanolic solution did not provide a measurable amount of thyme EO through model membrane, and it had a very low inhibitory rate (27%). The CE form had a cumulative amount of 9%, and the inhibition rate has increased to 47%, while the PnE form had 19% of cumulative amount, and the inhibition rate increased to 72%. These results indicate that the delivered amount of an EO with high antimicrobial effectiveness to the biofilm has the greatest effect on the inhibition activity. Beside the droplet size, the appropriate hydrophilic/lipophilic surface character is very important for effective delivery of EO to biofilm. We have found that PnEs stabilised with silica that has a moderate hydrophobic character (20ET), shows the highest delivery of EOs to biofilm that is accompanied with highest inhibitory effect.

We can conclude that O/W type PnEs stabilised by nanoparticles with appropriate hydrophilic/hydrophobic surface properties, provide a new possibility for the application of EOs in pharmaceutical treatment against *Streptococcus mutans* biofilm formation.

## Materials and Methods

**Materials.** Chemicals for experiments were all analytical grade and used as received. The sources and grade of all chemicals and materials used for experiments are discussed in the Supplementary Information.

**Synthesis- surface modification and characterisation of silica nanoparticles.** Synthesis of hydrophilic silica was performed based on the work of Stöber, Fink, and Bohn<sup>33</sup>. The optimisation of the synthesis process and surface modification with ETES was performed in our previous work<sup>31</sup>. We characterised the silica nanoparticles with DLS, TEM and FT-IR measurements. The brief synthesis route and further information about the measurements are given in the Supplementary Information.

**GC-MS and GC-FID conditions.** Detailed information on the applied analytical method can be read in the Supplementary Information.

**Broth macrodilution test (BDT).** With this test, we determined the MIC and MIC/2 values of each EO against *Streptococcus mutans*. The test was based on the recommendations of the Manual of Clinical Microbiology<sup>34</sup> associated with modifications published before<sup>35</sup>. Further details are given in the Supplementary Information.

**Preparation and characterisation of O/W type PnEs.** The concentration of emulsifiers was set to 1 mg/ml and was kept constant for all experiments. The influence of EOs concentration on the emulsion droplet size was examined; it was varied until the minimum inhibitory concentration against *Streptococcus mutans* (see Table 2.) The exact emulsification process, the droplet size, and stability measurements can be seen in the Supplementary Information.

**In vitro diffusion studies – Static Franz Diffusion cell method.** The examination of diffusion properties was performed in static vertical Franz diffusion cells (Hanson Microette Plus. Hanson Research 60-301-106). The essential oil content of samples was determined with UV-Vis spectroscopy (Jasco V-550 UV/VIS Spectrophotometer). To compare the effectiveness of PnEs, we examined the diffusion of EOs in an ethanolic solution and emulsion stabilised with Tween80 surfactant. Further information and details about the *in vitro* diffusion study are given in the Supplementary Information.

**Biofilm inhibition experiments.** The biofilm inhibition experiments were performed on the base of Peeters and co-worker's study, with the crystal violet assay<sup>36</sup>. The detailed method is written in the Supplementary Information.

**Preparation of the biofilm samples for Scanning Electron Microscopy.** The biofilm was imaged by SEM (JEOL JSM-6300) as previously described<sup>37</sup> with some modification (briefly see Supplementary Information). To determine the effect of EOs and different formulations, we have used control samples that were treated with ethanol and Tween80 solutions as well with the suspension of HS, 20ET or 40ET nanoparticles. Their concentration was the same as it was in the ethanolic solution, CEs, and PnEs<sup>38</sup>.

Received: 2 April 2019; Accepted: 15 October 2019;

Published online: 12 November 2019

## References

- Jacob, M. Ten Cate Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* **94**, 1–9 (2006).
- Slot, D. E., Dorfer, C. E. & Van der Weijden, G. A. The efficacy of interdental brushes on plaque and parameters of periodontal inflammation: a systematic review. *Int. J. Dent. Hyg.* **6**, 253–264 (2008).
- Jackson, M. A., Kellett, M., Worthington, H. V. & Clerehugh, V. Comparison of Interdental Cleaning Methods: A Randomized Controlled. *Trial. J. Periodont.* **77**(8), 1421–1429 (2006).
- Harrison, P. Plaque control and oral hygiene methods. *J. Ir Dent Assoc.* **63**(3), 153–156 (2017).
- Farah, C. S., McIntosh, L. & McCullough, M. J. Mouthwashes. *Aust Prescr* **32**(6), 162–164 (2009).
- Pizzo, G., La Cara, M., Licata, M. E., Pizzo, I. & D'Angelo, M. The effects of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse on supragingival plaque regrowth. *J. Periodont.* **79**(7), 1177–1183 (2008).
- Vlachojannis, C., Winsauer, H. & Chrubasik, S. Effectiveness and safety of a mouthwash containing essential oil ingredients. *Phytother Res.* **27**(5), 685–91 (2013).
- Hussain, K. & Saeed-ul-Hassan, S. Solubility of Essentials Oils by Non-alcoholic Agent. *J. Med Sci* **3**, 220–226 (2003).
- Zhang, J. *et al.* The effects of essential oil mouthrinses with or without alcohol on plaque and gingivitis: a randomized controlled clinical study. *BMC Oral Health* **18**, 6 (2018).



10. Mehling, A., Kleber, M. & Hensen, H. Comparative studies on the irritation potential of surfactants. *Food Chem. Toxicol* **45**(5), 747–58 (2007).
11. Leyes Borrajo, J. L. *et al.* Efficacy of Chlorhexidine Mouthrinses With and Without Alcohol: A Clinical Study. *J. Periodont.* **73**(3), 317–321 (2002).
12. Golebiowski, M. *et al.* Antimicrobial activity of alcohols from *Musca domestica*. *J. Exp Biol.* **215**, 3419–3428 (2012).
13. Pickering, S. U. Emulsions. *J. Chem. Soc.* **91**, 2001–2021 (1907).
14. Zhang, J., Elder, T. J., Pu, Y. & Ragauskas, A. J. Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles. *Carbohydr Polym.* **69**, 607–611 (2007).
15. Chen, J. F., Ding, H. M., Wang, J. X. & Shao, L. Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application. *Biomaterials* **24**(4), 723–727 (2004).
16. Astete, C. E. & Sabilov, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **17**(3), 247–289 (2006).
17. Binks, B. P. Particles as surfactants – similarities and differences. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7**, 21–41 (2002).
18. Rotello, V. M. *et al.* Nanoparticle-Stabilized Capsules for the Treatment of Bacterial Biofilms. *ACS Nano* **9**(8), 7775–7782 (2015).
19. Lu G.W. & Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery in *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* (ed. Kulkarni, V. S.) 59–94 (Elsevier Inc., 2010).
20. Chen, Y. *et al.* An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *Front Pharmacol.* **8**(287), 1–20 (2017).
21. Flemming, H. C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**(9), 623–633 (2010).
22. Breschi, L. *et al.* Hydrophilicity of dentin bonding systems influences *in vitro* *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Dent Mater.* **30**(8), 926–935 (2014).
23. Zhang, T. C. & Bishop, P. L. Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Wat. Res.* **28**(11), 2267–2277 (1994).
24. Ács, K. *et al.* Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement Altern Med* **18**, 227 (2018).
25. Kim, Y.-G., Lee, J.-H., Kim, S.-I., Baek, K.-H. & Lee, J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *Int J Food Microbiol* **195**, 30–39 (2015).
26. Kim, Y.-G. *et al.* Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep* **36**(1), 363–377 (2016).
27. Kang, J. *et al.* Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Sci Technol.* **101** (2019)
28. Wang, L. *et al.* Thymol kills bacteria, reduces biofilm formation, and protects mice against a fatal infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain L20. *Vet Microbiol* **203**, 202–210 (2015).
29. Pernodet, N., Maaloum, M. & Tinland, B. Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis* **18**(1), 55–58 (1997).
30. Lopetinsky, R. J. G., Masliyah, J. H. & Xu, Z. Colloidal particles at liquid interfaces - : Chapter 61.5.: Particle wettability and interfacial position; Cambridge University Press (2006).
31. Horváth, B., Szilárd, P. & Széchenyi, A. Preparation and *in vitro* diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles. *Flavour Fragr. J.* **33**(6), 385–396 (2018).
32. Jaiswal, M., Dudhe, R. & Sharma, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech.* **5**(2), 123–127 (2015).
33. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodispersed silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
34. Jorgensen, J. H. & Turnidge, J. D. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods in *Manual of clinical microbiology* (ed. Jorgensen, J. H.) 1253–1272 (ASM Press, 2015).
35. Ács, K., Bencsik, T., Böszörményi, A. & Kocsis, B. Horváth Gy. Essential oils and their vapors as potential antibacterial agents against respiratory tract pathogens. *Nat Prod Commun.* **11**(11), 1709–1712 (2016).
36. Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microliter plates. *J. Microbiol. Meth.* **72**, 157–165 (2008).
37. Vidács, A. *et al.* Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surface. *J. Mol. Liq.* **255**, 257–262 (2018).
38. Kerekes, E. B. *et al.* Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 933–942 (2013).

## Acknowledgements

Authors are grateful to Dr. Hajnalka Ábrahám and Prof. Dr. László Seress (University of Pécs, Faculty of Medicine. Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory) for the help and support by the sample analysis with SEM and TEM. Some TEM studies were performed using JEOL-1400 TEM electron microscope that was funded by the grant GINOP-2.3.3-15-2016-0002 (New generation electron microscope: 3D ultrastructure). We would also like to thank Erika Kerekes, PhD (University of Szeged, Faculty of Science and Informatics. Department of Microbiology, Hungary) for her help to acquire the process of biofilm formation and inhibition protocol. The project has been supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund (grant No. EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, grant title: Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs).

## Author contributions

A.Sz. Conceived and designed the study and edited the manuscript. B.H. performed synthesis and surface modification of silica nanoparticles, formulation, characterisation and diffusion study of Pickering emulsions, FT-IR, TEM and SEM experiments, she has written the draft of the paper and generated figures and tables. V.L.B have performed the microbiological tests and prepared the samples for SEM. A.V. and B.K. helped with the microbiological experiments. Gy.H. helped with the choice of essential oils and their analysis. A.B. performed the GC analysis. All authors have read and revised the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52998-6>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.S.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019