

Illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálata *in vitro* módszerekkel

Doktori (PhD) értekezés



Balázs Viktória Lilla

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Deli József egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Horváth Györgyi egyetemi docens

Társ-témavezető: Dr. Krisch Judit egyetemi docens

Pécsi Tudományegyetem

Gyógyszerésztudományi Kar

Farmakognóziai Intézet

Pécs, 2022

1. Bevezetés

Az antibiotikum-rezisztencia, amely többek között összefüggésben van a baktériumok biofilmképző sajátosságával, napjainkban rendkívül sok problémát okoz az egészségügyben. 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. 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 biofilm-képződés 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 használatára 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 légúti baktériumokat vontunk be. Kísérleti eredményeink megfelelő alapot biztosíthatnak az illóolajok antibakteriális szerként való alkalmazásához.

2. Célkitűzések

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 (mentol, fahéjaldehid, timol, eugenol) antibakteriális hatásának vizsgálata direkt bioautográfiás 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 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.

3. Anyag és módszer

3.1. Illóolajok kémiai összetételének meghatározása

Az illóolajok kémiai összetevőinek vizsgálatára a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv gázkromatográfias vizsgálatot ír elő. A gázkromatográfias 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 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. 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

3.2. Mikrobiológiai vizsgálatok

Vizsgálatainkba bevont légúti baktériumok: *Haemophilus influenzae* (DSM 4690), *H. parainfluenzae* (DSM 8978), *Streptococcus pneumoniae* (DSM 20566), *S. mutans* (DSM 20533), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

A baktériumok tenyésztése az alábbi körülmények között zajlott: *H. influenzae* és *H. parainfluenzae* 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 *S. pneumoniae* (DSM 20566), *S. mutans* (DSM 20533) és *P. aeruginosa* (ATCC 27853) esetében Brain Heart Infusion Broth (Sigma-Aldrich Kft.) táptalajt alkalmaztunk (Balázs et al., 2019).

3.2.1. Bioautográfias vizsgálatok

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 F₂₅₄). 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, fahéjaldehid-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: diklórmetán). 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 (4×10^7 CFU/ml) pontos beállítása optikai denzitásmérés segítségével 600 nm-en. Ezt követően a rétegeket a baktérium szuszpenzióba mártottuk, majd száradás után párakamrában 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. Az adatok további elemzéséhez Excel programot használtunk. Ennek 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 R_f értékek és vanillin-kénsavval adott színreakció alapján azonosítottuk. Ezután az illóolaj mintákat 10 µl (törzsoldat: 200 mg/ml) mennyiségben felvittük a vékonyrétegre, kifejlesztést követően a szilika réteget megfelelő zónákban „lekapartuk” (előzőleg meghatározott R_f értékek alapján), majd a frakciókat külön üvegebe gyűjtöttük és GC vizsgálatra küldtük.

3.2.2. 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 baktériumszuszenzióból, mind pedig a vizsgált illóolajból 100-100 µl mennyiséget mértünk a mikroplate lyukaiba. A vizsgálati anyag tápoldatban oldva került hozzáadásra. Az illóolaj mintákat három féle módszerrel készítettük elő. A

vizes bázisú baktériumszuszpenzióba történő oldáshoz Tween80 emulgenst (1%), abszolút etanolt, valamint Pickering-emulziót használtuk. 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 sejtszuszpenziós 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. Vizsgálataink során 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.

3.2.3. Pickering emulziók előállítása

A szilika nanorészecskék által stabilizált, illóolaj tartalmú O/W (Oil/Water, azaz olaj a vízben) típusú Pickering emulziók elkészítését a PTE GYTK Gyógyszer technológiai 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 funkciós 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. 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.

3.2.4. Illóolajok és komponenseik biofilm-képződésre kifejtett hatásának vizsgálata

A bakteriális biofilmeket 96 cellás polisztirol mikrotiter lemezeken (VWR, International Kft., Debrecen, Hungary) alakítottuk ki. Egy cellába 200 μ l 10^8 CFU/ml sejtszámú sejtszuszpenziót mértünk.

Inkubációt (4 h, 37°C) követően a le nem tapadt sejteket fiziológias sóoldattal (9 g NaCl, 1000 ml desztillált víz) kimostuk, és a letapadt sejtekhez hozzáadtuk a vizsgálni kívánt mintát. Inkubálást követően (24 h, 37°C) fiziológias sóoldatos mosás után minden mintahelyre 200 µl 99 $\frac{9}{10}$ %-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.

3.2.5. Biofilmek vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével

A SEM vizsgálatok előkészítése során a biofilmeket zsírtalanított fedőlemezekben alakítottuk ki. A 10⁸ 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 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 Tanszékében zajlott.

3.2.6. 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, (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 komponenseit és az MS detektorral történt mérés százalékos arányait a 2. táblázat foglalja össze, amelyekben az 1% feletti komponenseket tüntettük fel.

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

Komponens	RI	Komponensek százalékos értéke GC-MS mérés esetén (%)			
		borsmenta	fahéjkéreg	kakukkfű	szegfűszeg
α -pinén	939	1,1	5,1	-	-
kamfén	951	-	-	2,0	-
β -mircén	992	-	-	1,0	-
α -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	-
γ -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	-	-	-
α -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
Totál		98,1	99,7	93,2	98,5

4.2. Bioautográfiás vizsgálatok eredményei

Bioautográfiás 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 (3. táblázat). Ezt követte a *S. mutans*, amely szintén jelentősebb gátlást mutatott. A szegfűszeg illóolaja a hatásosságot tekintve követi a borsmenta aktivitását. A legnagyobb gátlási zónát a *S. pneumoniae* esetében észleltünk, 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, ezt követi a *S. pneumoniae*. 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. *Haemophilus* fajok esetében mi alkalmaztuk először ezt a módszert az illóolajok hatásosságának vizsgálata érdekében (Balázs et al., 2019).

3. táblázat Összillóolaj minták antibakteriális hatása direkt bioautográfiás tesztrendszerben, a gátlási zónák mm-ben értendők

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	10,98 ± 0,7	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	11,23 ± 0,7	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*

Annak érdekében, hogy a komponensek aktivitását alátámasszuk, vizsgálatunk részét képezte a komponensekre választott illóolajminták tesztelése.

Mindegyik baktériumtörzs esetében a **borsmenta** több komponense is gátló hatást eredményezett. A mentol (Rf=0,31) mindegyik baktériumtörzset gátolta. Emellett az 1,8-cineol (Rf=0,4), az izomenton (Rf=0,51) valamint a menton (Rf=0,68) mutatott gátló hatást. A *Haemophilus* nemzetség tagjai reagáltak a legérzékenyebben, hiszen itt detektáltuk a legjobban kivethető feltisztulási zónákat. A *P. aeruginosa*-t a főkomponensen kívül kis mértékben az 1,8-cineol és az izomenton gátolta. A *S. mutans* esetében halványabb zónákat figyelhettünk meg, a legintenzívebb komponensnek a mentol (Rf=0,31) bizonyult. A *S. pneumoniae* szintén több komponens esetén eredményezett feltisztulási zónát. A **fahéjkéreg** illóolajának komponensei közül a legaktívabb a fahéjaldehid (Rf=0,62) volt, továbbá az α -terpineol (Rf=0,35) eredményezett kismértékű gátlást mindegyik baktériumtörzs esetén. Az eugenol (Rf=0,76) hatása is megmutatkozott a *Haemophilus* fajoknál. A **kakukkfű** illóolajánál kifejezett gátlást a főkomponensnél (timol: Rf=0,56) figyelhettünk meg, továbbá a linalool (Rf=0,33) mutatott jelentős baktériumnövekedést gátló hatást. A **szegfűszeg** illóolaja esetén a legeredményesebb gátlást az eugenol (Rf=0,51) eredményezte, de nem elhanyagolható a limonén hatása sem (Rf=0,42), amely a *S. mutans* esetében mutatkozott meg a legkevésbé. 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 patogénekkal szemben. A legtöbb tanulmány az illóolajok főkomponensének tulajdonítja baktériumellenes hatását, azonban vizsgálataink alátámasztották, hogy a minor komponensek is rendkívül fontos szerepet játszanak az antibakteriális hatás kifejtésében (Balázs et al., 2019).

4.3. MIC értékek meghatározásának eredményei

Eredményeinkből (4. táblázat) 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.

4. 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

4.4. Az illóolajok biofilm gátló vizsgálatának eredményei

Az eredményeinket a kontrolltól való eltérés formájában szemléltetjük gátlási ráta százalékos arányának megjelölésével (Yanwei et al., 2018). Eredményeink alapján szembetűnő, hogy minden baktérium esetén a Pickering emulzió eredményezte a legkisebb mértékű kontrolltól (kezeletlen baktérium) való eltérést (1,35-1,81%). 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 legeffektívebb gátlást, hanem a nanotechnológiailag formulált minták. Vizsgálataink alátámasztották, hogy mind a négy illóolaj rendelkezik biofilm degradáló hatással a vizsgálatba bevont baktériumtörzsek esetén. Megállapítottuk, hogy a nanotechnológiailag formulált illóolaj sokkal hatékonyabban képes kifejteni hatását a hagyományos módszerekkel 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. Összességében eredményeink azt mutatják, hogy a *H. influenzae* baktériummal szemben mind a négy illóolaj hatásosnak bizonyult, leginkább hatásosnak a nanotechnológiailag formulált minták tekinthetők. A *H. parainfluenzae* esetében hasonló összefüggéseket figyeltünk meg, hiszen a nanotechnológiailag formulált illóolajok kiemelkedően aktívnak bizonyultak. A *H. parainfluenzae* esetében a fahéjkéreg

fejtette ki a legjelentősebb gátló hatást (etanolos oldat: 46,92%, Tween80 emulgéssel 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. A *P. aeruginosa* baktériumnál megfigyelhető, hogy a fahéjkéreg mutatta a legjelentősebb biofilm degradáló 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. A *S. mutans* esetében szintén a leghatékonyabbnak a fahéjkéreg illóolaja (85,96%) bizonyult, viszont számottevő gátló hatást detektáltunk a szegfűszeg illóolajának esetében is (73,06). A *S. pneumoniae* esetén szintén a fahéjkéreg illóolaja volt képes a leghatékonyabban degradálni a baktérium által képzett biofilmet (gátlási ráta etanolos 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 biofilm degradációs 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 Pickering-emulzió alkalmazása ígéretesnek bizonyul illóolajok formulálására, hiszen a legnagyobb biofilm degradációs hatással jellemezhető, önmagában (illóolaj nélkül) viszont nem fejt ki gátló hatást.

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 biofilm vizsgálatába is betekintést nyerhettünk.

A *P. aeruginosa* esetében a borsmenta eredményezte a legkisebb biofilm képződést gátló hatást, a baktériumsejtek épek maradtak, amelyek viszont már összetapadni nem voltak olyan mértékben képesek, mint ahogyan a kezeletlen kontroll esetén megfigyelhető. A fahéjkéreg illóolajával történő kezelés hatására a baktériumok sejtszerkezete teljesen deformálódott, feltételezhető, hogy funkcionálisan inaktívak. A *P. aeruginosa* esetében a fahéjkéreg illóolaját követve a leginkább aktív olajnak a szegfűszeget említhetjük. A borsmenta után a kakukkfű bizonyult a legkevésbé effektívnek, ugyan biofilm képződés nem valósult meg, ezzel szemben megfelelő struktúrával rendelkező sejteket figyeltünk meg az alginát nyák körül.

A *S. mutans* a borsmenta illóolajjal szemben mutatta a legintenzívebb ellenállást, mivel ebben az esetben egy kisebb *S. mutans* biofilm is felépült. A fahéjkéreg illóolajának kezelése következtében lecsökkent a sejtek száma, a szegfűszeg és a kakukkfű illóolaja szintén gátolni tudta a biofilm kialakulását. A sejtek letapadtak és mikrokolóniák is képződtek, de nem volt megfigyelhető összefüggő, háromdimenziós biofilm.

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 szintelen zónákat mértük (mm), ugyanis a baktérium színanyag termelése QS szabályozás alatt áll. A gátlási zónák méretét (mm) az 5. táblázat foglalja össze.

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. 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.

5. 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.

5. Új eredmények, Összefoglalás

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 illóolájának és azok komponenseinek gátló hatását *Haemophilus* spp. ellen. Összillóolaj vizsgálatok esetén megfigyeltük, hogy a legérzékenyebben a fahéjkéreg és a kakukkfű illóolájával 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 illóolájával 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 fahéjaldehyd, valamint az α -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 tesztrendszer 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. 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 rejtelmeibe 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 Farmakognóziái 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.

7. Irodalomjegyzék

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 Complement Altern Med.* 18:227.

Adams R.P. (2001): Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. 4th ed. Allured Publishing. Carol Stream. Illinois. USA

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.

Burt S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int J Food Microbiol.* 94: 223-253.

Horváth B. (2021): Pickering emulziók gyógyszer technológiai alkalmazása vízben nem oldódó hatóanyagok és illóolajok formulálására. Doktori disszertáció, Pécsi Tudományegyetem

Kerekes E. (2017): Illóolajok hatása élelmiszeriparban előforduló mikroorganizmusok biofilm képzésére és sejt-sejt közötti kommunikációjára. Szegedi Tudományegyetem.

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.

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.

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.

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.

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

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]

Czige 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-emléknap. 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.

A konferenciaszereplések összefoglalását a disszertáció tartalmazza.