



# Effect of Temperature, Surface, and Medium Qualities on the Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* and Their Influencing Effects on the Antibacterial, Biofilm-Inhibitory, and Biofilm-Degrading Activities of Essential Oils

Anita Seres-Steinbach<sup>1</sup>, Péter Szabó<sup>2</sup>, Krisztián Bányai<sup>3,4,5</sup>, György Schneider<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; seres-steinbach.anita@edu.pte.hu

<sup>2</sup> Department of Geology and Meteorology, Faculty of Sciences, University of Pécs, Ifjúság str. 6, H-7624 Pécs, Hungary; sz.piiit01@gmail.com

<sup>3</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary Medicine, H-1078 Budapest, Hungary; bkrota@hotmail.com

<sup>4</sup> National Laboratory of Infectious Animal Diseases, Antimicrobial Resistance, Veterinary Public Health and Food Chain Safety, University of Veterinary Medicine, H-1078 Budapest, Hungary

<sup>5</sup> Department of Medical Biology, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary

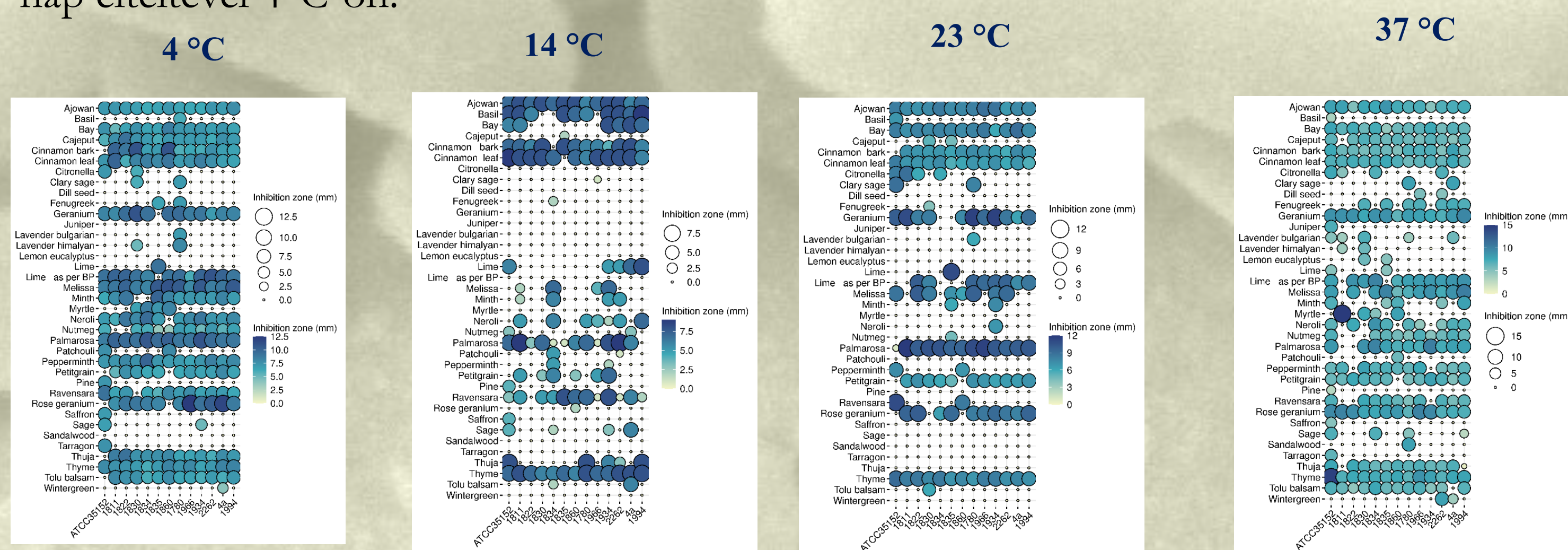
\* Correspondence: schneider.gyorgy@pte.hu; Tel.: +36-72-536000 (ext. 1908)

## ABSZTRAKT:

A *Listeria monocytogenes* egy élelmiszer-eredetű kórokozó, amely széles körű környezeti feltételekhez alkalmazkodik, ezért az élelmiszerláncban való ellenőrzése különösen nagy kihívást jelent. Az illóolajokat az utóbbi időben potenciális listeria ellenes szerként tartják számon. Ebben a tanulmányban 57 illóolaj listeria ellenes hatását teszteltük 13 különböző *L. monocytogenes* törzsön. Harminchét illóolaj bizonyult hatékonynak. 37°C-on az összes illóolaj hatékony volt legalább egy *L. monocytogenes* törzs ellen. 14°C-on és 23°C-on azonban 12 illóolaj, például a menta, a szerecsendió, a neroli, a borsmenta stb. drasztikusan hatástalanná vált. Az illóolajok hatékonysága a legalacsonyabb hőmérsékleten nőtt, mivel csak négy illóolaj, például a kapormag, a boróka, a citrom-eukaliptusz és a szantálfa bizonyult hatástalannak 4°C-on. Az ajowan és a kakukkfű voltak az egyetlen illóolajok, amelyek antibakteriális hatást mutattak minden törzs ellen az összes tesztelt hőmérsékleten (4, 14, 23, 37°C). 57 illóolajjal végzett biofilm-gátlási tesztek, amelyeket különböző felületű polisztirol lemezeken és rozsdamentes acélon végeztek, 0,1% és 0,5% végső koncentrációk alkalmazásával, az ajowan, muskátli, lime olaj, citromfű, palmarosa, rózsa muskátli, szantálfa és kakukkfű kiemelkedő gátló képességét mutatták. A fűszeres édeskömény, a citrom eukaliptusz és a kamilla képesek voltak gátolni a biofilm képződését anélkül, hogy befolyásolták volna az élő baktériumok számát. Az ajowan, a geránium, a kakukkfű és a palmarosa a biofilmet 0,0–0,08, OD: 0,0–0,075, 0,0–0,072, illetve 0,0–0,04 optikai sűrűsége csökkentette, szemben a baktériumkontroll 0,085–0,45 értékével. Az izolátumok különbözőérzékenységeit és a tesztelt illóolajok hőmérsékletfüggő antilisteriális hatását figyelembe kell venni, ha illóolaj-alapú élelmiszer-tartósítási technológiát kívánnak bevezetni, mivel több *L. monocytogenes* rezisztenssé válik különböző illóolajokkal szemben közepeshőmérsékleti tartományokban, például 14°C és 23°C között.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK: DROP PLATE

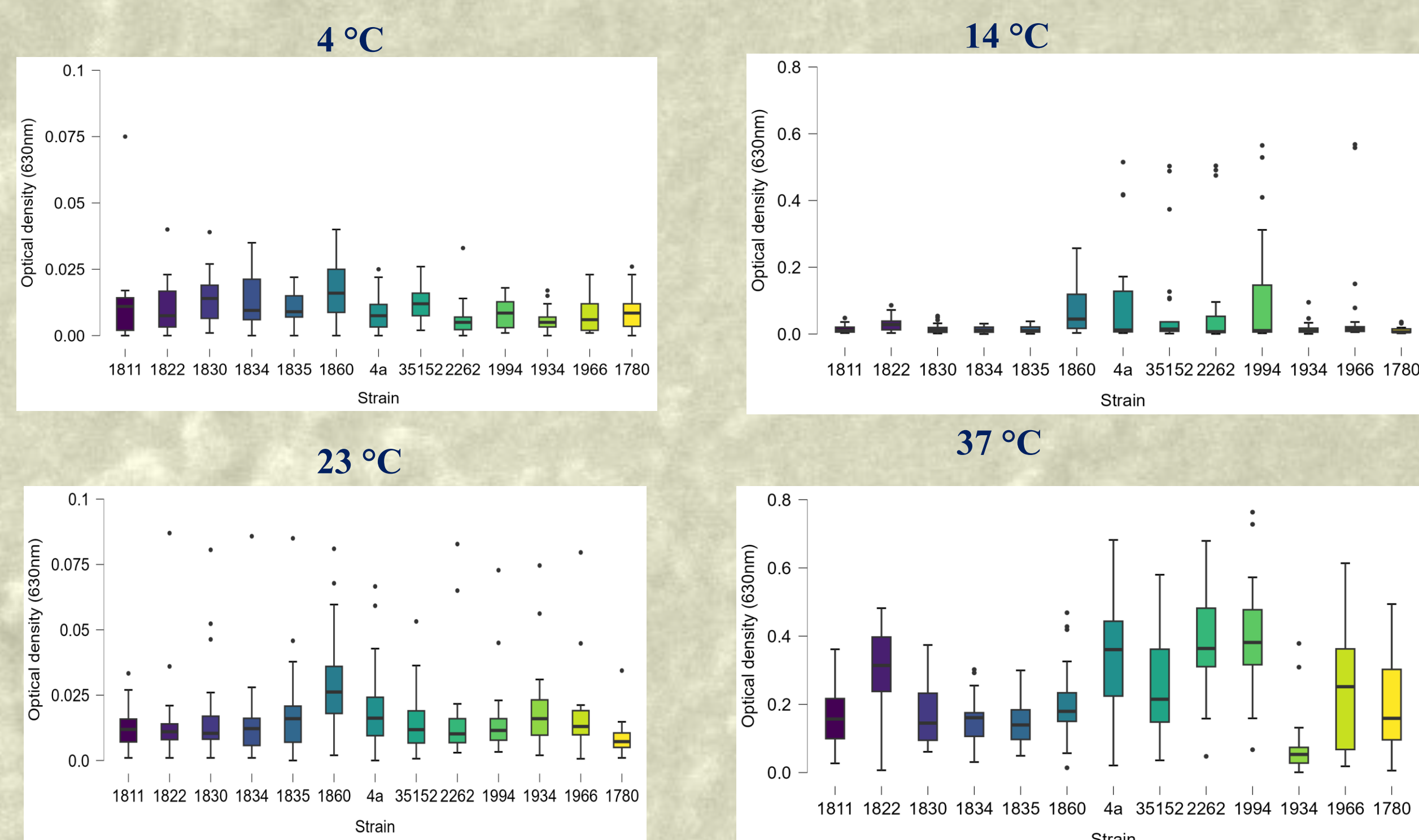
Illóolajok antibakteriális vizsgálatához 100 µL OD<sub>620</sub> = 0,2 baktériumszuszpenziót szélesztettünk Columbia véragar felületére steril háromszög alakú üvegbot segítségével. Szárítás után 5 µL (1%) illóolajat cseppentettünk a baktériumgyepekre, és 4°C-on, 14°C-on, 23°C-on és 37°C-on inkubáltuk. A gátlási zónák méretét 24 óra elteltével mértük 23°C-on és 37°C-on inkubált lemezeken, 48 óra elteltével a 14°C-on inkubált lemezeken, és négy nap elteltével 4°C-on.



## BIOFILM:

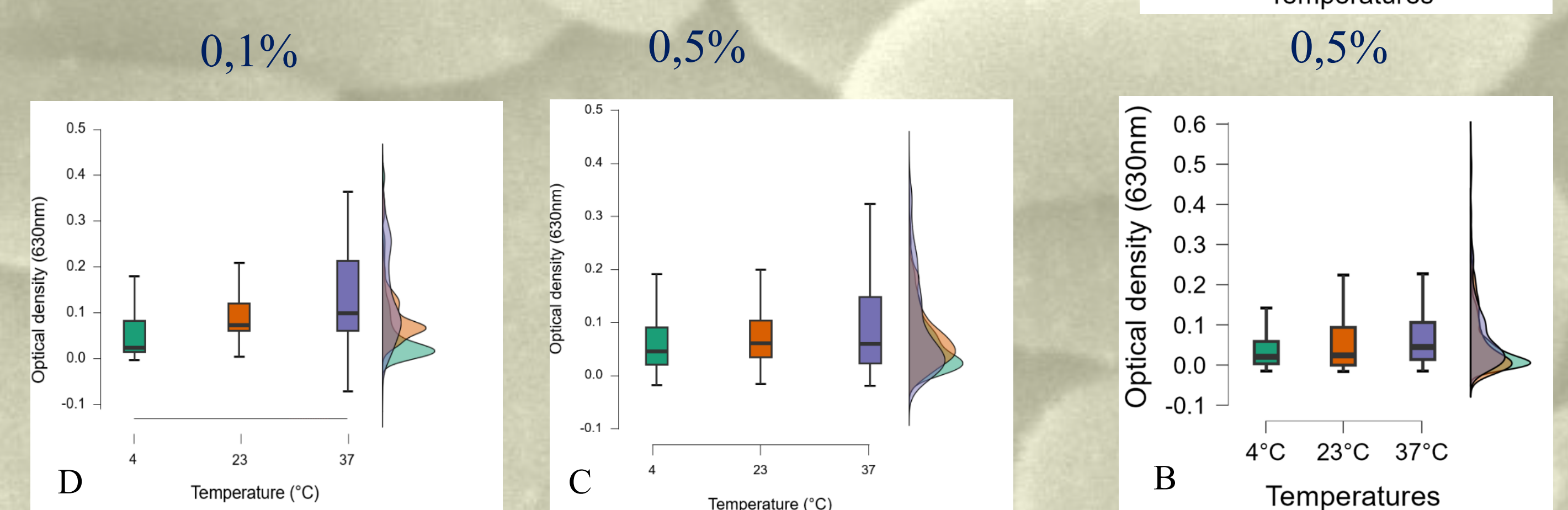
A 13 *L. monocytogenes* izolátum biofilmképző kapacitását 4°C, 23°C és 37°C-on határoztuk meg 96 lyukú polisztirol sejtenyésző lemezeken (Sarstedt, Nümbrecht, Németország), 3 különböző tapadási tulajdonsággal, például adhezív (lemez kód: 83.3924), komplex adhezív (lemez kód: 83.3924.300) és szuszpenziós sejtekhez szánt lemezekkel (lemez kód: 83.3924.500), rövidítve A, CAC és SC, valamint rozsdamentes acélhálós (SSM) lemezeken (0,27 × 0,27 × 0,16; Metmark Kft., Szekszárd, Magyarország), amelyek egységes méretűek (25 mm<sup>2</sup>) voltak. A vizsgálatokat különböző táptalajokban, például LB, MH-II és BHI, valamint csirkehúslében (CMJ) végeztük, az alkalmazott EO koncentráció 0,1 és 0,5% volt.

A tesztekhez az egyéjszakás (ON) baktériumszuszpenziókat (OD<sub>620</sub> = 0,2) 100-szorosára hígítottuk LB, MH-II vagy BHI tápfolyadékokban. A hígításokból 200 mikrolitert adtunk 96-lyukú lemezek lyukaihoz, és a lemezeket 23°C-on és 37°C-on 18 órán át, valamint 4°C-on 3 napig inkubáltuk.



## BIOFILM ERADIKÁCIÓ ÉS DEGRADÁLÁS:

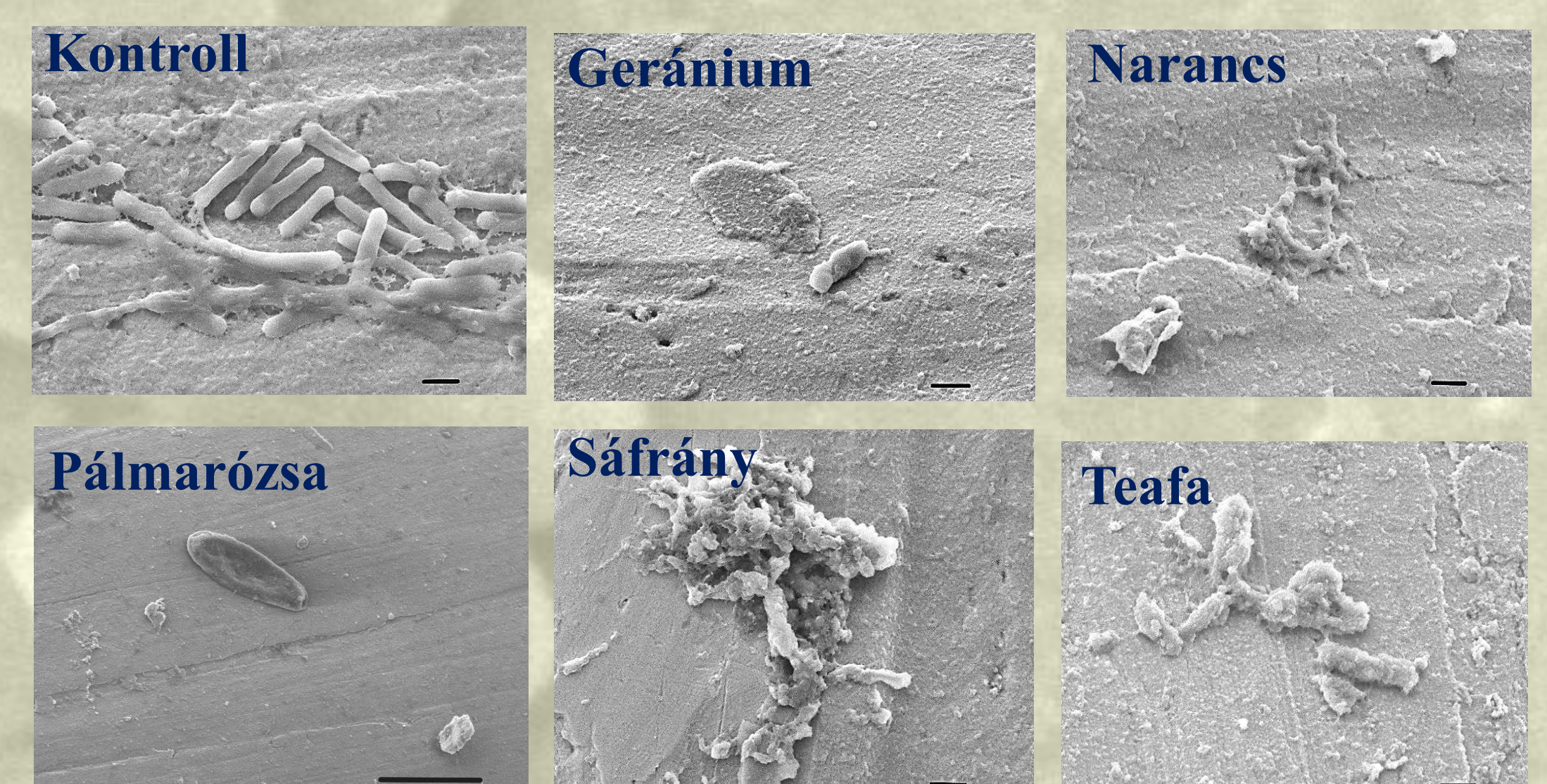
Az illóolajokat az inkubáció elején adtuk a baktériumszuszpenzióhoz 0,5% és 0,1% végkoncentrációban. A vizsgálatokat CAC-ok segítségével végeztük 23-, és 37°C-on 1 napig, valamint 4°C-on 3 napig, majd az élő baktériumszámot sorozathígításokkal határoztuk meg, miközben kristályibolya festést végeztünk a párhuzamos lyukakban.



A,B: biofilm eradikáció eredményei, míg C,D a biofilm degradáció eredményeit ábrázolja

## SEM:

A tapadó baktériumok vagy a képződött biofilm megjelenítéséhez a rozsdamentes acélok (SSS) felületén a korábban leírtak szerint pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) analízist végeztünk. Röviden, levegőn szárított mintákat vontunk be arannyal egy Jeol JFC-1300 automata finombevonó berendezéssel (Jeol, Tokió, Japán), majd a mintákat egy Jeol JSM-IT500HR (Jeol, Tokió, Japán) pásztázó elektronmikroszkóppal vizualizáltuk szekunder elektron módban. A képeket különböző nagyításokban készítettük 5 kV gyorsítófeszültség és 45 kV áram alkalmazásával



## EREDMÉNYEK:

Az eltérő *Listeria monocytogenes* törzsek jelentősen eltérő biofilmképző képességgel rendelkeztek.

Illóolajok anti-liszteriális hatása sok esetben hőmérsékletfüggő.

A kakukkfű, a fahéj, az ajowan, a geránium, a rózsageránium, a palmarózsa, Lime BP, a narancs és a szantálfa bizonyultak a leghatékonyabbnak a *L. monocytogenes* ellen.

## JÖVŐBELI TERVEK:

Legpotenciálisabb illóolajok segítségével hús felületéről eliminálni a baktériumot.

## REFERENCIA:

Schneider, G., Steinbach, A., Pütics, Á., Solti-Hodován, Á., & Palkovics, T. (2023). Potential of Essential Oils in the Control of *Listeria monocytogenes*. *Microorganisms*, 11(6), 1364.