

# **TDK DOLGOZAT**

**Nagy Dominika**

**2023**

# ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



## Gyógynövénykivonatokat tartalmazó készítmény antimikrobiális hatékonyságának *in vitro* meghatározása

Készítette:

**Nagy Dominika**

6. évf. ao. hallgató

Témavezetők:

Dr. Kerek Ádám

egyetemi tanársegéd

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Dr. Kovács László

egyetemi tanársegéd

ÁTE, Állathigiéniai, Állomány-egészségtani Tanszék és Mobilklinika

**Budapest**

2023

## Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Az antimikrobiális rezisztencia jelentősége.....	5
2.2. Antibiotikum alternatívák.....	7
2.2.1 A gyógynövényekről általában.....	7
2.2.2 <i>Thymus vulgaris</i> .....	11
2.2.3 <i>Mentha piperita</i> .....	11
2.2.4 <i>Eucalyptus globulus</i> .....	11
2.2.5 <i>Trachyspermum ammi</i> .....	12
2.2.6 <i>Cinnamomum camphora</i> .....	12
2.2.7 <i>Ocimum basilicum</i> .....	12
2.2.8 <i>Curcuma longa</i> .....	12
2.2.9 Egyéb antibiotikum alternatívák.....	13
2.3. Antibiotikum alternatívák hatásának vizsgálata brojlercsirkékben.....	13
2.4. Brojlercsirkék antibiotikum rezisztencia hordozása.....	14
3. Célkitűzések.....	16
4. Anyag és módszer.....	17
4.1. A vizsgált mikroorganizmusok és a gyógynövény kivonat eredete.....	17
4.2. Agardiffúziós módszer.....	17
4.3. Mikrodilúciós módszer.....	18
4.4. Vitalitás vizsgálat.....	20
5. Eredmények.....	21
5.1. Agardiffúziós eredmények.....	21
5.2. Mikrohigításos eredmények.....	22
5.3. Vitalitás vizsgálat eredményei.....	26
6. Következtetések.....	27
7. Összefoglalás.....	30
8. Summary.....	31
9. Irodalomjegyzék.....	32
10. Köszönetnyilvánítás.....	39

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MBC	Minimális baktericid koncentráció ( <i>Minimum bactericidal concentration</i> )
MFC	Minimális fungicid koncentráció ( <i>Minimum fungicidal concentration</i> )
MIC	Minimális gátló koncentráció ( <i>Minimum inhibitory concentration</i> )
TSB	Tripton-szója leves ( <i>Tryptone soy broth</i> )
WHO	Egészségügyi Világszervezet ( <i>World Health Organization</i> )

## 1. BEVEZETÉS

Az antimikrobiális rezisztencia széles körben való terjedése folyamatos kihívást jelent az orvostudomány és gyógyszerészet számára a bakteriális és gombás fertőzések kezelésében. Az antibiotikumok és antimikotikumok fontos eszközei ezen fertőzések kezelésének, de a mikroorganizmusok egyre gyakrabban mutatnak rezisztenciát a korábban hatékony gyógyszerekkel szemben. Ezért egyre nagyobb figyelem irányul a természetes eredetű készítményekre, mint potenciális alternatívákra az antimikrobiális kezelések területén. A természetes gyógynövénykivonatokat tartalmazó készítmények ígéretes antibakteriális és antimikotikus hatásokkal rendelkezhetnek, azonban biológiai sokféleségük miatt hatékonyságukat *in vitro* módszerekkel tesztelni kell. Az Egy Egészség (One Health) tükrében közös érdekünk, hogy mind a köz-, mind pedig az állategészségügy számára megőrizzük az antimikrobiális szerek hatékonyságát, ezek használatának csökkentése, részben vagy egészben történő kiváltásának egyik lehetséges alternatív megoldásai lehetnek a gyógynövények.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Az antimikrobiális rezisztencia jelentősége

Az antibiotikum rezisztencia terjedése napjaink egyik legjelentősebb problémája. A nem megfelelő és túlzott mértékű antibiotikum használat nehezen vagy egyáltalán nem kezelhető fertőzések kialakulásához vezethet. A régóta alkalmazott antibiotikumok sok esetben ma már hatástalannak bizonyulnak, a multirezisztens baktériumok megjelenése pedig komoly gondot okoz, mivel már az újabban felfedezett antibiotikumok, valamint a végső megoldásként alkalmazott („*last-resort*”) antibiotikumokkal szemben is egyre gyakrabban alakul ki rezisztencia [1, 2].

Az antimikrobiális szerek túlzott mértékű alkalmazásának hatása megjelenik mind a humán- és állategészségügyben, de még a mezőgazdaságban is megfigyelhető a hatása [3]. A legújabb tudományos kutatásokon és felméréseken alapuló becslések szerint, amennyiben nem történik radikális változtatás az antibiotikum felhasználásának mértékében és módjában, 2050-re évente tízmillió halálos áldozattal lehet számolni ebből fakadóan [3, 4]. Az antibiotikum rezisztencia terjesztésében szerepet játszanak azok rezervoárjai, mint például a szennyezett föld, víz, a kórházak, ipari területek, mezőgazdasági hulladékok [5].

Az antibiotikumok iránti kereslet a köztudatba kerülésük óta eltelt 60 évben ugrásszerűen megnőtt, használatuk egyre nagyobb mennyiségben és egyre szélesebb körben terjedt el, aminek következtében megugrott a rezisztencia mértéke is [6]. Ennek egyik legfőbb oka az antimikrobiális szerek nem előírás szerű- és nem megalapozott okkal történő használata. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint akkor megfelelő az antibiotikum használata, ha a beteg a gyógyszert megfelelő okból, megfelelő dózisban és a szükséges ideig kapja, pontos tájékoztatással ellátva, amely a lehető legkisebb költséggel jár a beteg és a társadalmat illetően. Ha ezek közül bármelyik feltétel nem teljesül, azzal sérül a helyes felhasználás feltételrendszere [7]. A helytelen antibiotikum felhasználás leggyakoribb okai közé tartozik a hiányos tájékoztatás arról, hogy mely esetben szükséges az alkalmazásuk [7, 8], sőt egyes országokban az antibiotikumok recept nélküli elérhetősége, valamint az, hogy a háztartásokban nagy számban megmarad az előírt, el nem fogyasztott antibiotikum, ok-okozati összefüggésben áll a nem megfelelő dózisban, nem megfelelő ideig és nem előírás szerinti alkalmazásukkal [7].

Az állategészségügyben, leginkább a fejlődő országokban, komoly problémát okozhat a nem terápiás céllal történő antibiotikum felhasználás, legfőképp a profilaxisként és

metafilaxisként, takarmányban vagy ivóvízben való alkalmazásuk [3, 5, 6, 9–11]. Kína és Brazília a legnagyobb antibiotikum felhasználók közé tartoznak a haszonállattartás területén. Dél-és Délkelet-Ázsia intenzív állattartása egyre növekszik, ezzel együtt az antibiotikum felhasználásuk is. Napjainkhoz képest 2030-ra egyes elemzők szerint szignifikáns mértékben meg fog nőni az antibiotikum felhasználás Indonézia (202%), Nigéria (163%), Mianmar (205%), Peru (160%) és Vietnám (157%) területén. Bangladesben a gazdálkodók 94,16%-a használ antibiotikumot, amiből a teljes antibiotikum felhasználás 70%-a az állattartásban jelenik meg [12]. A hozamfokozásra adott antibiotikumok javítják a takarmányhasznosítás mértékét, ezzel gyorsítják a súlygyarapodást [3], amit a hatóanyag terápiás dózishoz képest alacsonyabb dózisban történő alkalmazásával, teljes állományok kezelése során érnek el [5, 9]. Ezeket a szereket baromfifélékben gyakran a teljes felnevelés ideje alatt alkalmazzák [9]. A nem egyenletes felvétel következtében a vízzel, talajjal és bélsárral környezetbe került maradékanyagok hozzájárulnak a környezet terheléséhez, ezáltal a rezisztencia terjedéséhez [3, 10, 13], az állati eredetű termékek, élelmiszerek révén pedig eljutnak a fogyasztókig [14], hozzájárulva a humán rezisztencia kialakulásához [10]. Az élelmiszer által közvetített antibiotikum maradékanyagokat leírták sertés-, baromfi- és marhahúsban, valamint sertés májban, tejben és tojásban, halban és rákokban is [13].

A felszíni, valamint a szennyvizekben az antibiotikumok koncentrációja átlagosan 0,01-1,0 µg/l között ingadozik, tehát a főbb ivóvíz forrásokban analitikai módszerekkel kimutathatók. Az antibiotikum maradvány a vizeken keresztül bejut a talajba, ahol a szer feldúsul. Az eddigi vizsgálatok során levegőből nem tudtak kimutatni antibiotikumot, valamint azok maradványait sem [13]. Zöldségekben és gyümölcsökben a trágyázás következtében szintén leírták már az antibiotikum maradékanyagok jelenlétét [5, 9, 13].

A WHO mindezek következtében indítványozta az antibiotikumok hozamfokozás céljából történő felhasználásának tilalmát. Európában tilos az állattenyésztésben az antibiotikumok hozamfokozás céljából történő felhasználása, más országokban pedig, például Kanadában vagy az Egyesült Államokban, korlátozásokat vezettek be [9, 14, 15]. Az Európai Unió az 1831/2003/EK rendelete alapján tiltja az antibiotikumok hozamfokozás céljából történő alkalmazását [16]. A fejlődő országokban azonban továbbra is korlátozások nélkül alkalmazzák ezeket a szereket, mellyel részben képesek kompenzálni a rossz telephigiéniát, illetve tartástechnológiai körülményeket, ezáltal csökkentik az állattartók kiadásait és növelik a termelékenységet, ennek révén pedig a bevételt. Ennek ellenére az antibiotikumok hozamfokozás céljából történő használatának betiltása óta egy svéd felmérés



szerint nem változott a termelékenység szintje [10]. Ez felveti a kérdést, hogy az antibiotikumok ilyen jellegű használata valóban anyagi haszonnal jár-e, hiszen azokat rendszeres, folyamatos ütemezésben kell alkalmazni. Ez állandó kiadással jár, de ha az adott telep befektet annak fejlesztésébe, például a higiéniai- és járványvédelmi állapotok javításába, a tartástechnológia fejlesztésébe, akkor az egyszeri nagyobb kiadás hosszabb távon megtérülő előnyökkel járhat [17, 18].

Ezen tényezők mindegyike hozzájárulhat a rezisztens vagy multirezisztens baktériumok megjelenéséhez. A rezisztens *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus* és *Campylobacter* törzsek legfőbb hordozói az élelmiszertermelő állatok [9, 11]. A megfelelően megválasztott terápiás dózissal jó eséllyel megakadályozható a rezisztens patogén vagy fakultatív patogén, de akár kommenzalista baktériumok kiszelektálódása, az ennél alacsonyabb dózis viszont hozzájárul különböző mutációkon keresztül a rezisztencia kialakulásához [13].

## **2.2. Antibiotikum alternatívák**

Az antimikrobiális rezisztencia a 21. század problémája, ami ráirányította a figyelmet a különböző alternatívák keresésére [19, 20], amelyek sok esetben nemcsak antibakteriális, hanem tumorelles, antivirális szerként is alkalmazhatóak [21].

### **2.2.1 A gyógynövényekről általában**

A gyógynövényeket és azok kivonatait évezredek óta használják a népi gyógyászatban, mind kozmetikai és mind gyógyászati célból [22]. A WHO felmérése szerint napjainkban az emberek 80%-a használ terápiás célból gyógynövényeket [23]. Ezek a növények vagy növényi részek általában 20-70%-ban két-három fő összetevőből állnak, de egyéb összetevők, például zsírsavak vagy különböző kénzarmazékok is megtalálhatók bennük [22]. Az ezekből kivont illóolajok legfőképpen terpénekből, terpenoidokból, alifás és aromatikus részekből épülnek fel [24, 25]. Ezeket az olajokat egy-két tipikus fenolos összetevő jellemzi, úgy mint például a karvakrol vagy timol [24]. A kémiai összetétel meghatározása gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometriával (GC-MS) történik, mellyel azok százalékos aránya határozható meg [26–30].

A százalékos arányt befolyásolja az adott földrajzi környezet, a talajösszetétel, a talajművelési módszerek, ezen felül az adott év- és napszak, a begyűjtés, a tárolás és a feldolgozás, az illóolaj kinyerésének módszere a növényből, de az összetevők arányának vizsgálati módszere is hatással van az eredményre, ezért pontos, egységes illóolaj összetétel

nem határozható meg [25, 26]. Ahhoz, hogy a jövőben állatokon is alkalmazni lehessen illóolajokat, nemcsak a kémiai összetevők meghatározása a fontos, hanem az adagolás, tárolás módja, valamint azok kölcsönhatása például a bélmikrobiommal [26, 31]. Az illóolajok direkt alkalmazása esetében megoldást kell találni arra, hogy a magas reaktivitásukat csökkentsük, vagyis azon tulajdonságukat, ami által könnyedén kölcsönhatásba léphetnek a környezet vagy a takarmány egyes elemeivel, miközben a biológiai aktivitásukat megőrizzük. Az illóolajok stabilitását sok tényező befolyásolhatja, ezek közül a legfontosabbak a hőmérséklet, a fény, a különböző fémek, a víz és az oxigén mennyisége. Az illóolajok kölcsönhatásba léphetnek a takarmány egyes összetevőivel, mely befolyásolhatja azok működési mechanizmusát, például a magas rosttartalmú takarmányok csökkentik a hatékonyságukat. Az UV-fény, a magas hőmérséklet, páratartalom mind oxidatív folyamatokat válthatnak ki az illóolajokban, befolyásolva biológiai hatásukat. Ezek kivédésére új módszereket, például úgynevezett enkapszulációt fejlesztenek ki, melyek megvédik az illóolajokat a környezet hatásaitól, miközben előnyös tulajdonságaikat ki tudják fejteni. A mikroenkapszuláció során különböző anyagokkal (pl. liposzóma, protein-poliszacharid komplex) védik az illóolajat a külső hatásoktól, ami két fő funkciót lát el: az oxidatív, fény, hőmérséklet stabilitásának és az illóolaj biológiai aktivitásának fenntartását valamint hogy az illóolaj a megfelelő helyen (pl. vékonybél) fejtse ki a hatását [26, 31, 32].

Az illóolajok kinyerése történhet lepárlással, hidrodessztillációval, vízgőzdesztillációval vagy egyéb mechanikus úton, például hidegen sajtolással [22, 33, 34]. Az illóolajok hatékonyabb, azok aktív összetevőinek kinyerése érdekében olyan új technikák is megjelentek, mint a szuperkritikus folyadék extrakció (SCFE), szuperkritikus extrakció víz vagy szén-dioxid felhasználásával, ultrahangos asszisztált extrakció (UAE), mikrohullámos asszisztált extrakció (MAE), oldószermentes mikrohullámos asszisztált extrakció (SFME) és mikrohullámú hidrodifúzió és gravitációs (MHG) módszerek [26, 35].

A gyógynövények antibiotikus és gombaellenes hatásának vizsgálatára két általánosan használt *in vitro* módszer létezik. Leggyakrabban minimális gátló koncentráció (MIC), minimális baktericid koncentráció (MBC) és minimális fungicid koncentráció (MFC) értékek meghatározását végzik [24]; a másik lehetőség agaron történő gátlási zónák meghatározásával történik, papírkorong diffúziós módszerrel [28, 36, 37]. Az agaron történő meghatározásnál egy specifikus baktérium vagy gomba törzset oltanak szilárd táptalajra, majd az adott gyógynövény illóolajával, vagy kémiai komponensének oldatával átitatott szűrőpapírkorongot helyeznek a táptalaj felszínére. Az inkubációs idő után megfigyelhető,

hogy kialakul-e gátlási zóna. Minél nagyobb a szűrőpapírkorong körüli zóna, annál erősebb gátló hatást fejt ki az illóolaj a baktériumra vagy gombára [38].

A MIC az antimikrobiális hatású szerek azon legkisebb koncentrációja, amely hatásosan gátolja az adott baktériumtörzs vagy gomba növekedését, míg az MBC és MFC azon koncentrációk, amelyek mellett már elpusztul az adott kórokozó [39, 40]. A MIC, MBC és MFC értékek meghatározásánál kettes alapú hígítási sort készítenek. Az illóolajok lipofil tulajdonságának áthidalása érdekében valamilyen oldószerben (detergensben) hígítják az illóolajokat, mielőtt a hígítási sort elvégeznék. Ilyen például a dimetil-szulfoxid (DMSO), a metanol vagy az etanol. A munkalemezre a tápleves bemérése után, az előre meghatározott hígítási sort készítik el, az adott illóolajjal, hatóanyaggal. Ezután mérik be a vizsgált baktérium- vagy gombatörzset a lemez összes lyukába. Minden esetben van egy pozitív (baktérium/gomba van, illóolaj nincs) és egy negatív kontroll (csak tápleves). A hígítási sor elkészítése után meghatározott hőmérsékleten, meghatározott ideig inkubálják azt, majd megnézik, hogy melyik az a legkisebb hígítás, amelyben már nem szaporodott a kórokozó [39]. A vírusellenes hatékonyság vizsgálata történhet mikrolemezen, vírustitrálással sejtszuszpenzióban. Az inkubációs idő elteltével a vírusok citopatogén hatásának mértékét vizsgálják meg különböző illóolajok koncentrációi mellett [41]. Az antivirális tulajdonság egyik lehetséges oka az inozin-monofoszfát-dehidrogenáz enzim, mely gátolja a *de novo* szintézisét a guanin nukleotidnak, amit kurkuma (*Curcuma longa*) esetében írtak le [42].

Az illóolajok biofilmellenes hatása meghatározható a minimális biofilm gátló koncentráció (MBIC) és a minimális biofilm eradikáló koncentráció (MBEC) vizsgálatával [39]. Humán eredetű *Pseudomonas aeruginosa* esetében a kerti bazsalikom (*Ocimum basilicum*) és az orvosi zsálya (*Salvia officinalis*) illóolaja is mutatott biofilmgátló hatást, valamint a már érett biofilm csökkenését tapasztalták. A kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris*) illóolaja gátolja az *Enterococcus* biofilm képzését azzal, hogy befolyásolja a sejtegységet és az exopoliszacharid képzését [34]. A kurkuma (*Curcuma longa*) képes csökkenteni a biofilm képzésért felelős transzkripciós gén expresszióját és csökkenti a virulenciafaktorok megjelenését [42].

A gyógynövényeket és az azokból kivont illóolajokat az antimikrobiális szerek hatékony kiváltására fordíthatják a jövőben, széleskörű biocid aktivitásuk hatékonyra teszi akár multirezisztens baktériumok és gombák ellen is őket [24, 41, 43, 44]. A kémiai

hatóanyagok közül például a karvakrol, eugenol vagy a cinnamaldehyd fungicid hatást fejtenek ki *Candida albicans* (*C. albicans*) ellen, azon törzsek esetében is, melyek rezisztensek voltak a hagyományos gombaellenes szerekkel szemben, mint például az amphotericin-B vagy a flukonazol [41].

Az illóolajok kombinációja a klinikumban használt antibiotikumokkal megoldást jelenthet az antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia csökkentésére [45, 46]. Az illóolajok visszaállíthatják az antibiotikumokkal szembeni érzékenységet és kiszélesíthetik az antimikrobiális spektrumot. Multirezisztens baktériumokkal szemben bizonyos illóolajok és antibiotikumok kombinációja növelheti az adott baktérium érzékenységét. *In vitro* vizsgálatok során az ajovan (*Trachyspermum ammi*) és timol kombinációja képes növelni a ciprofloxacinnal szembeni hatékonyságát *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) és *Streptococcus pneumoniae*-vel szemben. Ennek oka, hogy ezen illóolajok nemcsak a membrán egységét képesek megbontani, hanem a fehérjék és örökítőanyag szintézisét is befolyásolják, ezzel erősítve a ciprofloxacinnal szembeni DNS szintézis gátló hatását. Ugyanezen illóolajok erősítették az amoxicillin hatását a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) baktériummal szemben [45].

A legtöbb kutatás szerint az illóolajok hatékonyabbak lehetnek Gram-pozitív baktériumok ellen, aminek az oka lipofil tulajdonságuk, és ebből kifolyólag az, hogy penetrálni képesek a sejtfalon keresztül, ezzel megzavarva a membrán és a membránon belüli részek egységét és az energiatermelést [26, 34, 47, 48]. A fahéjfa (*Cinnamomum zeylanicum*) illóolajában a cinnamaldehyd és eugenol karbonil-csoportjuk által képesek meggátolni az enzimek termelődését, mely megköti és inaktiválja a baktériumok sejtfalát, melyet *Salmonella* esetében írtak le. Továbbá gátolja a *S. aureus* törzsek szaporodását a citromverbéna (*Aloysia triphylla*), mely a plazmamembrán szerkezeti egységét bontja meg, ezzel a citoplazma és a sejtservecskék elvesztését okozza, ami sejthalált eredményez [34].

Az illóolajok gombaellenes hatása szorosan kötődik azok fenolt tartalmazó alkohol összetevőjéhez. *In vitro* és *in vivo* hatékonyságot mutattak ki oregánó illóolajának esetében, amit a karvakrol összetevőjének tulajdonítanak [25]. Az illóolajok gombák metabolizmusára kifejtett hatása kimutatható fluoreszcein-diacetát (FDA) felhasználásával, mely bejut az intakt sejtbe, ahol az addig színtelen és nem fluoreszcens vegyület hidrolízis útján egy polárosabb, sárgás-zöldes fluoreszcens anyaggá alakul át. Ennek gátlása illóolajok jelenlétében mutatja azok hatékonyságát gombákkal szemben. Ez a hatékonyság 20%-tól

60%-ig is terjedhet *C. albicans* esetében, oregánó, rozmaring, levendula, bazsalikom, ánizs és grapefruit illóolaj különböző koncentrációiban *in vitro* vizsgálatok alapján [49].

### 2.2.2 *Thymus vulgaris*

A kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris*) a Lamiaceae családba tartozó gyógynövény [21]. Legfőbb kémiai összetevője a timol, ezen kívül jelentős még a p-cimén, a  $\gamma$ -terpinén tartalma [22, 27, 29, 37], melyeknek köszönhetően az egyik legjelentősebb antimikrobiális hatással rendelkező gyógynövényként tartják számon [28]. Megfigyelték *Salmonella* [14, 27], *C. albicans* [25, 27, 37] *Enterococcus* [27, 29, 34, 37], *Staphylococcus* [29, 34], és *E. coli* [27, 34, 37] fajokkal szembeni antibakteriális hatását. Ezen túlmenően nemcsak antimikrobiális hatását írták le, hanem növekedésserkentő hatást is megfigyeltek, valamint képes a biofilm megbontására és annak eradikációjára is használható [27].

### 2.2.3 *Mentha piperita*

A borsmenta (*Mentha piperita*) a Lamiaceae család tagja, aminek körülbelül 30 fajtája ismert. A *Mentha piperita* két faj természetes hibridje: *Mentha spicata* L. és *Mentha aquatic* L. [22]. A *Mentha piperita* illóolajának két legfontosabb összetevője a mentol és menton [22, 36, 40]. Brojlercsirkék *in vivo* vizsgálatai során a *Mentha piperita* hatására takarmányfelhasználás növekedést, a belső szervek tömegének növekedését, és csökkent mortalitást figyeltek meg [50]. Hatása bizonyított többek között *E. coli* [21, 22, 34, 36], *S. aureus* [22, 38], *Enterococcus faecium* [38], *C. albicans* [22], *Salmonella enterica* [22] ellen. Gyomor-bélrendszeri görcsoldásra is alkalmazható, ami szélhajtó, epehajtó, antibakteriális és nyálkaoldó hatásának köszönhető [38].

### 2.2.4 *Eucalyptus globulus*

A golyós eukaliptusz (*Eucalyptus globulus*) a Myrtaceae családba tartozó gyógynövény, mely Ausztrália egyik legjellegzetesebb növénye [22, 38]. *In vitro* vizsgálatok során az eukaliptusz olajnak antibakteriális és gombaölő hatását figyelték meg, ezen felül meggátolja a prosztaglandin szintézisét. Állatkísérletekben köhögéscsillapító és surfactant hatását is megfigyelték. Belsőleg alkalmazzák hurutoldásra és külsőleg reumás panaszokra [38]. Az *Eucalyptus globulus* illóolaj főbb kémiai összetevője az eukaliptol, ezen felül megtalálható benne az  $\alpha$ -terpineol,  $\gamma$ -terpinén és  $\alpha$ -pinén [22, 24].

Antibakteriális hatását kimutatták *in vitro* vizsgálatok során *E. coli*, *S. aureus* [22] esetén. *In vivo* kísérletekben brojlercsirkéknél eukaliptusz hatására növekedett a testtömeg, viszont csökkent a takarmányhasznosítás. A vakbélflóra esetében növekedést tapasztaltak a

tejsavbaktérium számában és csökkenést az *E. coli* esetében. Javult a látszólagos emésztés, csökkent a szérum koleszterol szintje, csökkent a telített, és nőtt a telítetlen zsírok aránya a combizomban [51].

### **2.2.5 *Trachyspermum ammi***

Az ajovan (*Trachyspermum ammi*), az Apiaceae családba sorolható gyógynövény [30, 43]. Az olaját a magból nyerik ki, ennek legfontosabb hatóanyaga a timol, ezen kívül tartalmaz cimolt,  $\alpha$ -pinént, dipentént,  $\gamma$ -pinént és karvakrolt [23, 35, 45]. Tradicionálisan köhögés, gyulladások, hasmenés, fejfájás, magas vérnyomás, hasi fájdalom, bronchitis és influenza kezelésére használják [30]. Antibakteriális és gombaellenes hatása mellett kimutatták rovarellenes hatását is. Valószínűsíthetőleg ez magas monoterpén koncentrációjának tudható be [35]. A baktériumok közül hatékony *E. coli* [23, 35], *Salmonella* fajok ellen [43], valamint gombák közül *C. albicans* esetén írtak le hatékonyságot [30].

### **2.2.6 *Cinnamomum camphora***

A közönséges kámforfa (*Cinnamomum camphora*) a Lauraceae családba tartozó növény, mely szubtrópusi területeken honos [20]. Elsődleges kémiai összetevői a linalool, eukaliptol, sabinene,  $\alpha$ -terpineol, kariofillén, nerolidol,  $\alpha$ -pinén, kámfor és  $\beta$ -pinén [20]. Antibiofilm hatását is leírták, mely hozzájárulhat a rezisztens baktériumok visszaszorításához, például a tejelő teheneknél visszatérő endometritist okozó *E. coli* törzsek esetében [20, 39]. Antibakteriális hatását kimutatták nemcsak *E. coli* [20, 46], hanem *S. aureus* ellen is [20].

### **2.2.7 *Ocimum basilicum***

A bazsalikom (*Ocimum basilicum*) a Lamiaceae család tagja, Ázsia, Afrika, Közép- és Dél-Amerika trópusi és szubtrópusi területein őshonos, körülbelül 70 fajtája ismert [25, 44]. Régóta használatos megfázás, láz, köhögés, asztma, arcüreggyulladás, reumás tünetek enyhítésére és a sebgyógyulás elősegítésére [44]. Illóolajából 47 komponens vonható ki, közülük legjelentősebb az esztragonol, 1,8- cineol és a transz- $\alpha$ -bergamotén. Hatékonyságát leírták többek között *E. coli* [34, 36], *C. albicans* [25, 37] és *Enterococcus* fajok [37] ellen.

### **2.2.8 *Curcuma longa***

A kurkuma (*Curcuma longa*) a Zingiberaceae család tagja. A fő kémiai összetevői a kurkuma gyökértörzséből származó fenolos kurkumin és más kurkuminoidok. Régóta használják ételszínező fűszernövényként, ismert antimikrobiális és rovarriasztó szerként

is [42]. Antioxidáns hatása jelentős, képes gátolni a reaktív nitrogén szabadgyökök (RNS), valamint a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) képződését. A kurkuma indirekt módon is kifejtheti antioxidáns hatását, csökkentve például a kataláz, a  $\gamma$ -glutamilcisztein, a ligáz, a glutation az S-transzferáz, a glutation-reduktáz, a glutation-peroxidáz, a szuperoxid-dizmutáz működését. *In vivo* kísérletekben patkányokon gátolta a lipid peroxidációt [21]. Széleskörű antibakteriális, antivirális és gombaölő hatását figyelték meg *S. aureus* [21, 42], *E. coli*, *Salmonella typhimurium* és *C. albicans* esetén [42].

### **2.2.9 Egyéb antibiotikum alternatívák**

Az egyéb antibiotikum alternatívák közül meg kell még említeni a baktériumok egyes mechanizmusainak gátlásában, befolyásolásában való beavatkozási lehetőségeket, ilyen például a membrán permeabilitás fokozása, az efflux pumpák aktivitásának csökkentése, a kináz enzim és intrinsic antibiotikum rezisztencia gátlása, anti-regulátorok, antibakteriális virulencia faktorok, mikrobiom modulálása, bakteriofágok használata [19]. Másik megközelítési lehetőség azon táplálékkiegészítők használata, mely a mikrobiom helyreállítására és egészségének fenntartására helyezik a hangsúlyt [48, 52]. Ezek között felsorolható a pro-és prebiotikumok beépítése a takarmányozásba, a takarmány minőségének ellenőrzése, enzimkiegészítés, szerves savak adagolása [48], valamint ciklikus diguanozin-monofoszfát alkalmazása [52].

### **2.3. Antibiotikum alternatívák hatásának vizsgálata brojlersirkékben**

A baromfiállományok kezelésében egyre erősebb a törekvés az antibiotikumok használatának jelentős csökkentésére, valamint azok részben vagy egészben történő kiváltására [53]. A gyógynövények növekedésre kifejtett hatásának, valamint patogének elleni hatásának vizsgálatára széleskörű paraméterek monitorozása szükséges. Egyik megközelítés a napi tömeggyarapodás folyamatos nyomon követése, a takarmányhasznosítás, a vágási súly és belső szervek tömegének mérése, valamint az elhullás mértéke [50]. Másik lehetőség, hogy a növekedés mértéke mellett hematológiai értékeket, immunválaszt is mérünk. A lecentrifugált vérmintából biokémiai profil felállítása (glükóz, húgysav, totál koleszterin, trigliceridek, HDL-hez valamint LDL-hez kötött koleszterolszint) szükséges. Immunológiai szempontból antitest mérésére is van lehetőség különböző kórokozókkal szemben [53].

A mikrobióta és a bélrendszer morfológiájának nyomon követése is alkalmas lehet az antibiotikum alternatívák hatásának megfigyelésére. A bélrendszeri baktériumoknak fontos

befolyása van annak egészségre, valamint az állat növekedési erélyére. Feltehetőleg az illóolajok segítenek a bélbeli probiotikus baktériumok szabályozásában, pozitívan befolyásolják az epithelium morfológiáját, ezzel hozzájárulnak a táplálékfelvétel növekedéséhez [54].

Ennek megítélésére mérhető a vékonybél különböző szakaszain (*duodenum*, *jejunum*, *ileum*) a bélbolyhok magassága [54, 55], a vakbélből származó minták összetétele [55, 56]. A bélbolyhok morfológiája mind makroszkopikusan mind mikroszkopikusan vizsgálható, az összehasonlítás szakirodalmi és előzetes kutatási alapokra helyezhető. Ennek során megfigyelhető paraméterek az epithelium vastagsága, az enterociták proliferációja, a kehelysejtek növekedése, valamint az esetleges léziók összehasonlítása [55]. Számos kutatás kiterjed egyes kórokozókkal fertőzött csoportok vizsgálatára, például *Salmonella enterica* vagy *Clostridium perfringens* esetén [14, 47, 57].

#### **2.4. Brojlercsirkék antibiotikum rezisztencia hordozása**

Az élelmiszertermelő állatok közül a baromfi állományokban a második legmagasabb az antibiotikum felhasználás mértéke [33]. Az antibiotikum túlhasználása és az abból eredő rezisztencia globális probléma. A brojlercsirke állományokban széleskörben használt antibiotikumok lehetővé teszik, hogy azok rezervoárként működjenek rezisztens baktériumok számára [15]. Ezek közé tartoznak például a *Salmonella* fajok, az *E. coli*, a *Campylobacter* fajok és a *Clostridium perfringens* [14, 52].

A szubterápiás mennyiségben adagolt antibiotikumok legjelentősebb előnye a növekedési erély fokozása. Ennek oka, hogy az antibiotikumok csökkentik a patogének mennyiségét az állatban, míg elvékonyítják a nyálkahártyaréteget, és felerősítik az immunrendszer aktivitását. A legfontosabb hatásuk, hogy befolyásolják a bélrendszer mikrobiomját, csökkentve annak enzimműködését. Ezzel együtt növelik a tápanyagok felszívódását és a hasznos baktériumok mennyiségét [33]. Az antibiotikumokat korábban megelőzés (profilaxis), megelőzés és terápiás célból együttesen (metafilaxis) és terápiás célból is használták. Az Európai Unióban 2006 óta, míg az Egyesült Államokban 2017 óta tiltott az antibiotikumok hozamfokozó célból történő felhasználása, azonban Brazíliában és Kínában nincs ilyen jellegű korlátozás [15].

Élelmiszertermelő haszonállataink esetén a használható antibiotikumok mennyiségét a maximális maradékanyag szint (MRL) határozza meg, melyet mind az EU országaiban, valamint az USA-ban is alkalmaznak. Ez a maximálisan megengedett farmakológiailag aktív



anyagok, vagy annak metabolitjainak állatokból származó élelmiszerekben történő kimutathatóságán alapszik. Ez az érték termékenként változó lehet és az egyes országoktól is függ a határértéke [14].

A fentiek ellenére egyes kutatások szerint a hústermékek tartalmaznak antibiotikumokat, az Európai Unión belül például jelentős a doxiciklin és az enrofloxacin maradvány [14]. A legtöbb antibiotikum takarmánnyal vagy vízzel kerül az állatokba, melynek bizonyos százaléka nem szívódik fel a gyomor-bélrendszerben, ennek eredményeképpen pedig a felvett antimikrobiális szernek akár 90%-a kijuthat a környezetbe, amit bizonyítottak is bacitracin, klórtetraciklin, monenzin, penicillin, virginamicin esetén. Ez a jelentős környezetterhelés pedig fokozottan hozzájárulhat az antimikrobiális rezisztencia további terjedéséhez [52].

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy egy mentolt, eukaliptusz olajat, kakukkfűolajat, kámfort, ajwan olajat, bazsalikom olajat és kurkuma olajat tartalmazó gyógynövény illóolaj készítménynek *in vitro* hatékonyságát vizsgáljuk köz- és állategészségügyi szempontból jelentős baktérium és gombatörzseken. Napjaink kiemelt problémája a baktériumokkal és gombákkal szembeni rezisztencia globális és széles körű terjedése. Ezért szükség van különböző alternatívákra, amelyek segítségével csökkenthetők vagy egyes esetekben kiválthatók az antimikrobiális szerek használata. A gyógynövényekből kivonható illóolajok erre adhatnak lehetőséget. A vizsgálatok során agardiffúziós és mikrodilúciós módszerek segítségével néztük a kombinált készítmény hatékonyságát. Az *in vitro* eredmények tükrében pedig lehetőség nyílik további *in vivo* vizsgálatok tervezésére a jövőben.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. A vizsgált mikroorganizmusok és a gyógynövény kivonat eredete

Az agardiffúziós vizsgálatokhoz a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campus, Takarmányozástani és Takarmányozás-élettani Tanszékének törzsgyűjteményét használtuk fel. A mikrodilúciós vizsgálatokhoz a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék korábbi, baromfiból izolált és Microbank™ rendszerben (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada) -80 °C-on tárolt törzseket használtunk fel. A törzsek listáját az **1. táblázat** foglalja össze.

#### 1. ábra A vizsgálatokhoz felhasznált mikroorganizmusok

Agardiffúzió		Mikrodilúció	
Faj	Mennyiség	Faj	Mennyiség
<i>E. coli</i>	1 db	<i>E. coli</i>	16 db
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 db	<i>Salmonella</i> spp.	16 db
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 db	<i>Enterococcus</i> spp.	16 db
<i>S. aureus</i>	1 db	<i>S. aureus</i>	16 db
<i>C. albicans</i>	1 db	<i>C. albicans</i>	8 db

A vizsgált készítményt a Garuda Trade Kft. bocsájtotta rendelkezésünkre, Liq-Biotic itatófolyadék névvel. Összetételét tekintve a termék mentol, eukaliptusz, kakukkfű, kámfor, ajwain, bazsalikom és kurkuma illóolaj kivonatokat tartalmazott.

### 4.2. Agardiffúziós módszer

A vizsgálathoz Petri-csészéket használtunk, melyek Müller-Hinton táptalajt (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország) tartalmaztak. A 12 órás mikrobatenyésztést követően a baktériumszuszpenziókból egy-egy agarra 0,1 ml-t szélesztettünk. A lemezekben steril dugófúróval lyukakat vágunk (4 mm átmérő), amelyekbe a vizsgált készítményből 0,1 ml-t mértünk be. A kontroll lyukakba a baktériumot nem tartalmazó tápleves került. Végezetül a Petri-csészéket 37 C-on 18-24 órán keresztül inkubáltuk, majd a lyukak körül kialakult gátlási zónák nagyságát értékeltük. Minden vizsgálatot négy ismétlésben végeztünk. A vizsgálatok alapját a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium Növény- és Talajvédelmi Főosztálya által kiadott fungicid és baktericid vizsgálati módszertan képezte [58].

### 4.3. Mikrodilúciós módszer

A -80 °C-on tárolt baktériumtörzseket a vizsgálatot megelőző napon 3 ml tripton-szója levesbe (TSB) oltottuk, majd 18-24 órán át inkubáltuk 37 °C-on. A vizsgálatokat 96 lyukú mikrotiter lemezeken (VWR International, LLC., Debrecen, Magyarország) végeztük el. A munkalemezek első oszlopának kivételével a lyukakat 90 µl TSB-vel (1. lépés) töltöttük fel (1. ábra). Ezt követően elkészítettük a készítmény törzsoldatának feles hígítását TSB-vel, így a kettes alapú hígítási sor a vizsgált készítmény kétszeres hígításával kezdődött és egészen annak 1024x hígításáig tartott. A feles hígításból 180 µl-t mértünk a munkalemezek első oszlopába (2. lépés), majd 2-es alapú hígítási sort készítettünk belőle (3. lépés), a munkalemez 10. oszlopa után a felesleges oldatot pipettaheggyel együtt eldobtuk, így minden oszlopban 90 µl oldat maradt. Minden baktériumtörzs vizsgálatához egy-egy sort használtunk a munkalemezen (2. ábra).

#### 1. lépés: feltöltés

↓ 90 µl

	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
B		90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
C		90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
D		90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
E		90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
F		90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
G		90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
H		90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-

2. ábra A lemezek feltöltése 90 µl TSB-vel

#### 2. lépés: bemérés 3. lépés: hígítási sor készítése

90 µl feleslegben kidob


↓ 90 µl

	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
B	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
C	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
D	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
E	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
F	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
G	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
H	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-

3. ábra Kettes alapú hígítási sor készítése, az első oszlop feltöltése 180 µl kiindulási koncentrációval, majd 90 µl tovább mérése és szuszpendálása a 10. oszlopig

Egy segédlemezen 25-szörös hígításban 0,5 McFarland értékre beállítva előkészítettük a baktériumok ráoltásához szükséges baktériumszuszpenziót. Ehhez minden segédlemezt 240 µl TSB-vel töltöttünk fel (**3. ábra**), majd minden lyukba 10 µl alaposan vortexelt baktériumszuszpenziót mértünk (4. lépés). Ezt követően a baktériumtörzseket az elkészített munkalemezre oltottuk, a kettes alapú hígítási sort tartalmazó lemezek 11. oszlopától kezdve haladva visszafelé minden lyukba 10 µl baktériumszuszpenziót pipetázva a segédlemezről (5. lépés). A 11. oszlop pozitív kontrollként szolgált (baktériumszuszpenzió és leves), a 12. oszlop negatív kontrollként (csak leves) szolgált (**4. ábra**).

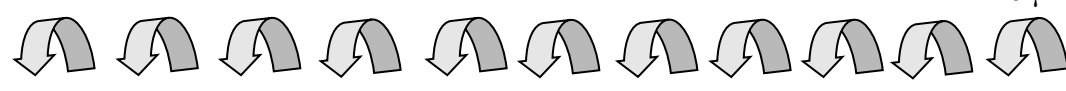
**4. lépés: a baktériumszuszpenzió beállítása 0,5 McFarland értékre**



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	240		240		240		240		240		240	
B	240		240		240		240		240		240	
C	240		240		240		240		240		240	
D	240		240		240		240		240		240	
E	240		240		240		240		240		240	
F	240		240		240		240		240		240	
G	240		240		240		240		240		240	
H	240		240		240		240		240		240	

**4. ábra** A baktériumszuszpenzió 25x hígításának elkészítése segédlemezen

**5. lépés: a baktériumszuszpenzió bemérése**



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
B	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
C	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
D	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
E	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
F	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
G	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
H	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-

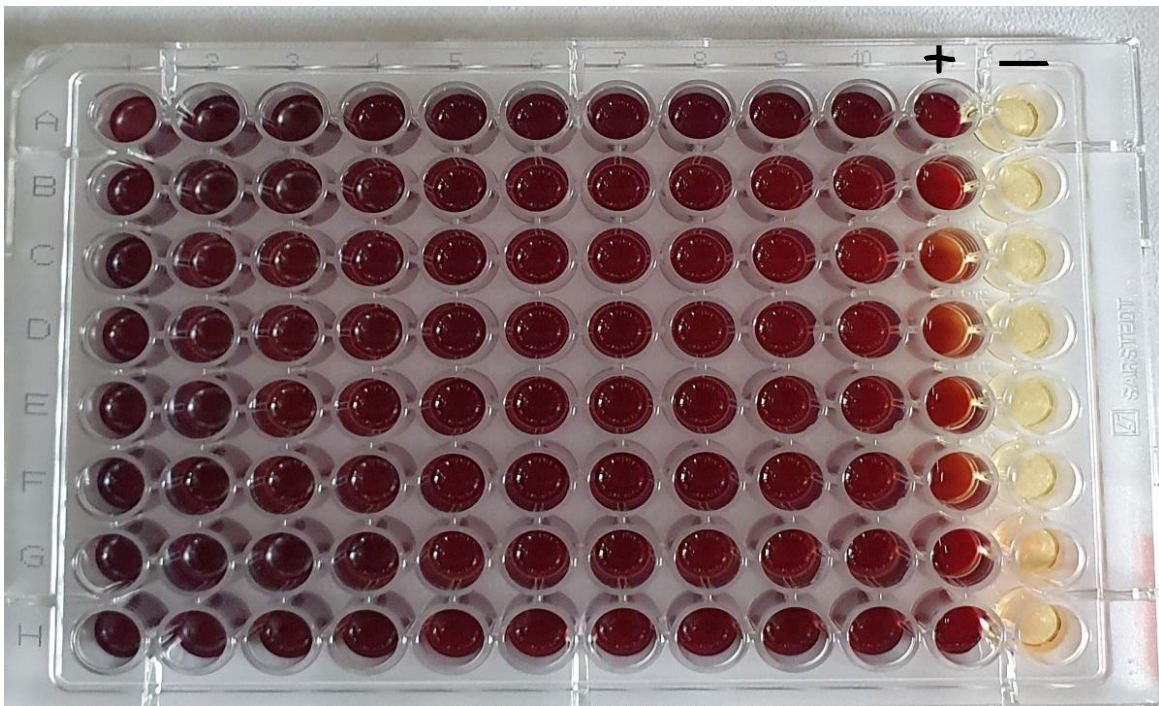
**5. ábra** A baktériumszuszpenzió rámérése a munkalemezre a pozitív kontrolltól kezdve

A munkalemezeket ezt követően 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd vizuálisan elbíráltuk a MIC értékeket a pozitív (11. oszlop) kontrollhoz viszonyítva, a zavarosodás mértéke alapján bíráltuk el: +++ (jelentős), ++ (mérsékelt), + (enyhe), ±0 (nehezen megítélhető), - (nincs). A - és ± jelöléssel ellátott lyukakat negatív eredménynek tekintettük, míg pozitív eredménynek a +, ++, +++ jelöléssel ellátott lyukak minősültek.

#### 4.4. Vitalitás vizsgálat

A vizsgálathoz új munkalemezeket készítettünk, melyek első oszlopát kivéve minden oszlopba 90 µl Müller-Hinton levest pipettáztunk, az első oszlopba pedig a készítmény 1:1 arányú hígítását 180 µl mennyiségben, majd kettes alapon végig hígítottuk. Baktérium fajoként 4-4 db törzset vizsgáltunk. Elkészítettük a korábbiakban leírt baktériumhígító lemezt: 240 µl leveshez 10 µl mikroba szuszpenziót mértünk a tömény baktérium szuszpenziókból. A hígított szuszpenziókból 10 µl-t pipettáztunk a lemezek megfelelő oszlopaiba. A lemezeket 24 órán keresztül inkubáltuk 41 °C-on. Az inkubációt követően a 100 µl szuszpenziót tartalmazó lyukakhoz 20 µl MTS-formazán oldatot pipettáztunk. 1,5 óra inkubációt követően spektrofotométer segítségével 492 nm-en leolvastuk az abszorbancia értékeket.

A kísérletünkben alkalmazott MTS-formazán vitális festés használata során kapott abszorbancia értékekből következtettünk a kezelést követő élő baktériumsejtek mennyiségére, a pozitív (+) és negatív (-) kontrollhoz képest (**6. ábra**). Az abszorbancia értékek segítségével kiszámoltuk a lyukakban lévő életképes mikrobák százalékos csökkenését a pozitív kontrollokhoz viszonyítva. Hatékony baktériumszám csökkenésnek azon koncentrációk tekinthetők, melyek esetén az életképes mikrobák mennyisége legalább a felére csökkent (EC<sub>50</sub> érték).

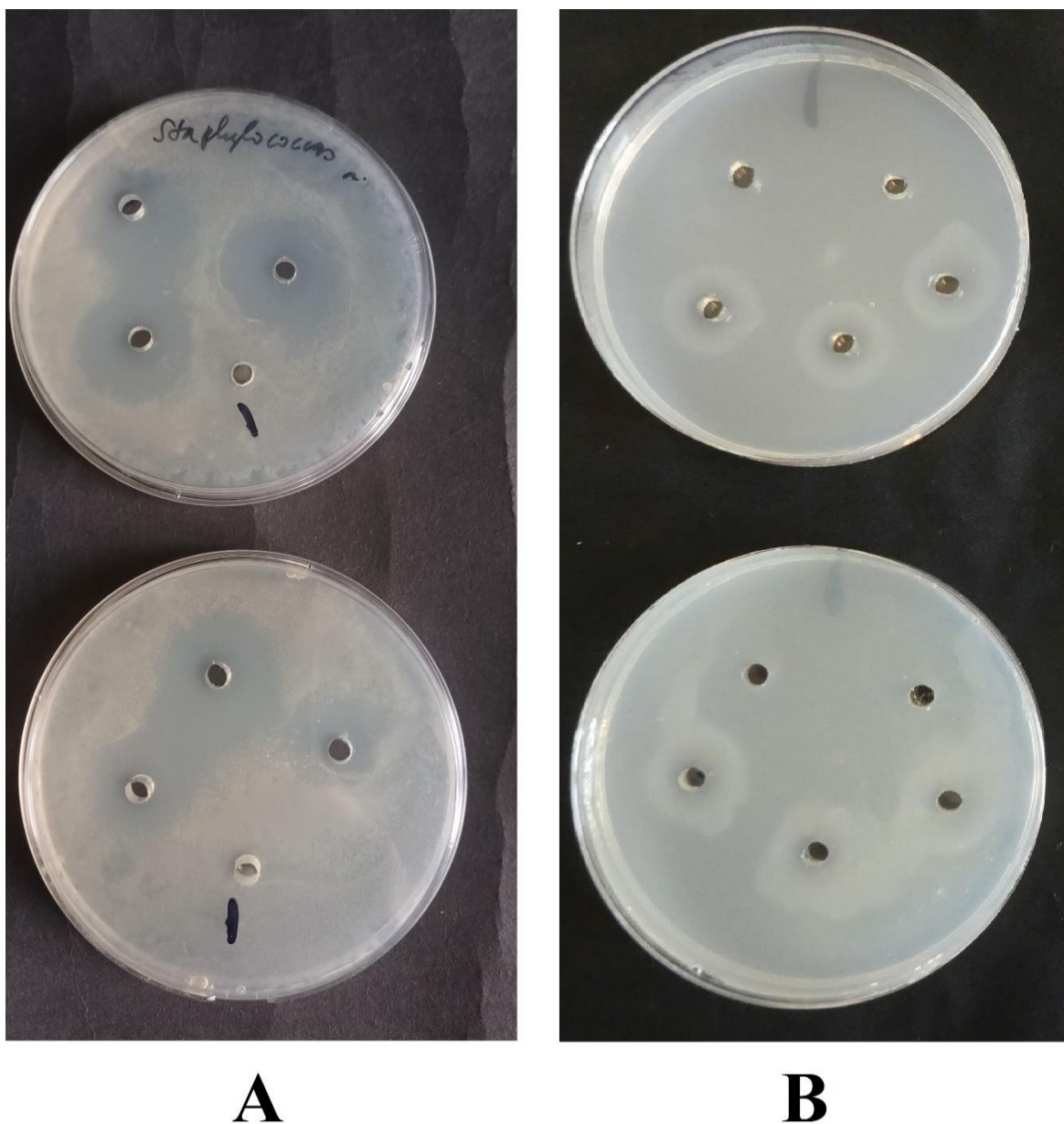


**6. ábra** Az MTS-formazánnal történő kezelést követő színreakció. A + jelölés a pozitív kontroll, a – jelölés pedig negatív kontroll során tapasztalható színreakció.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Agardiffúziós eredmények

Az eredmények alapján a készítménynek antimikrobiális hatása volt megfigyelhető *S. aureus* baktériumra nézve, a gátlási zóna átlaga 15,89 mm volt, 2,15 mm szórással. Gyenge hatás volt megfigyelhető *Enterococcus faecalis* esetén, a gátlási zóna átlaga 6,58 mm volt, 0,67 mm szórással; *E. coli* és *Pseudomonas aeruginosa* esetén a gátlási zónák átlagai 5,17 ( $\pm 1,27$  SD) és 5,56 mm ( $\pm 2,01$  SD) voltak. Szintén gyenge volt a megfigyelhető hatás *C. albicans* esetén, ahol a gátlási zóna átlaga 7,58 mm, szórása 1,00 mm volt (7. ábra).



7. ábra Az agardiffúziós vizsgálat eredményei. Az „A” ábrarészen a *S. aureus* esetén, a „B” ábrarészen a *C. albicans* esetén megfigyelhető kialakult gátlási zónák láthatók.

Az eredmények értékelése során a  $\leq 8$  mm gátlásói zóna esetén nem feltételezünk hatást, 8-12 mm között mérsékelt érzékenységről beszélünk,  $>12$  mm esetén pedig érzékenynek tekintjük a törzset.

## 5.2. Mikrohígítási eredmények

A mikrohígítási módszerrel végzett vizsgálat eredményei közül a 16 baromfi eredetű, párhuzamos vizsgálat során egyöntetűen jól látható volt a baktériumok szaporodása, minden esetben zavarosodást tapasztaltunk. A pozitív kontroll pozitív volt, a negatív kontroll esetén nem tapasztaltunk befertőződést. A készítmény 2x, 4x és 8x hígítása esetén tapasztaltunk mérsékelt zavarosodást (++) , az ennél nagyobb hígítások erős zavarosodást (+++) mutattak (2. táblázat). Ez alapján megállapítható, hogy a készítmény legkisebb, 2x hígításban önmagában nem alkalmas bakteriosztatikus hatást kifejteni az *E. coli* baktériumfaj ellen, az első három hígításban tapasztalt mérsékelt zavarosodás viszont arra utal, hogy némi hatást kifejti a baktériummal szemben. Ez egybevág az agar diffúziós vizsgálat során tapasztalt kisebb méretű gátlási zóna megjelenésével.

**2. táblázat** Az *E. coli* törzsek (1-16. izolátum) MIC vizsgálatának eredményei a zavarosodás mértékének jelölésével, az egyes hígítások esetén

1. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>E. coli</i>	1.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	2.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	3.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	4.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	5.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	6.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	7.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	8.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

2. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>E. coli</i>	9.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	10.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	11.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	12.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	13.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	14.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	15.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>E. coli</i>	16.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-



A *Salmonella* fajokon végzett párhuzamos vizsgálatok szintén egyöntetűen ugyanazt az eredményt mutatták, mint amit az *E. coli* esetén tapasztaltunk. Tehát a három legkisebb hígítás mérsékeltebb zavarosodást mutatott, ami arra utal, hogy a baktériumok nem tudtak annyira hatékonyan szaporodni, mint az ennél nagyobb hígítások esetén. Egy törzs esetben tapasztaltunk enyhe zavarosodást, azonban ott is csak a 2x hígítás során (**3. táblázat**). Eredményeinket a vitalitás vizsgálat során kapott eredmények is alátámasztották. Tehát önmagában a készítmény *Salmonella* fajok esetén sem alkalmas arra, hogy teljes mértékben gátolja a baktériumok szaporodását.

**3. táblázat** A *Salmonella* spp. törzsek (1-16. izolátum) MIC vizsgálatának eredményei a zavarosodás mértékének jelölésével, az egyes hígítások esetén

3. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>Salmonella</i> spp.	1.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	2.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	3.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	4.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	5.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	6.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	7.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	8.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

4. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>Salmonella</i> spp.	9.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	10.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	11.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	12.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	13.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	14.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	15.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Salmonella</i> spp.	16.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

Az *Enterococcus* fajok esetén hasonló módon csak a három legkisebb hígítás esetén tapasztaltuk a mérsékelt zavarosodást (**4. táblázat**). Összességében tehát elmondhatjuk, hogy önmagában a készítmény nem tudja teljes mértékben meggátolni a vizsgált izolátumok szaporodását.

**4. táblázat** Az *Enterococcus* spp. törzsek (1-16. izolátum) MIC vizsgálatának eredményei a zavarosodás mértékének jelölésével, az egyes hígítások esetén

5. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>Enterococcus</i> spp.	1.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	2.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	3.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	4.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	5.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	6.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	7.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	8.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

6. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>Enterococcus</i> spp.	9.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	10.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	11.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	12.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	13.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	14.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	15.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Enterococcus</i> spp.	16.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

A készítmény legkifejezettebb hatása *S. aureus* esetén volt megfigyelhető. A 2x hígítás esetén enyhe zavarosodás volt megfigyelhető a legtöbb törzs esetén, egy törzs esetében a 4x hígításnál is, egy törzs esetén pedig az összes hígításban enyhe zavarosodás volt látható (**5. táblázat**). A mikrohígításos eredményeink egybevágóan a vitalitás vizsgálat során tapasztalt százalékos csökkenés mértékével, valamint korrelálnak az agardiffúziós vizsgálat során megfigyelt gátlási zónák méretével. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a készítmény leginkább a *S. aureus* baktérium okozta fertőzések kiegészítő kezelésében lehet a legígéretesebb a gyakorlati felhasználás során.

**5. táblázat** A *S. aureus* törzsek (1-16. izolátum) MIC vizsgálatának eredményei a zavarosodás mértékének jelölésével, az egyes hígítások esetén

7. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>S. aureus</i>	1.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	-
<i>S. aureus</i>	2.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	3.	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	4.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	5.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	6.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	7.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	8.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

8. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>S. aureus</i>	9.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	10.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	11.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	12.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	13.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	14.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	15.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	16.	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

A *C. albicans* gomba esetén szintén csak a készítmény három legkisebb hígítása során figyeltünk meg mérsékelt zavarosodást, az összes többi esetben nem csökkent a zavarosodás mértéke a pozitív kontrollhoz képest (**6. táblázat**).

**6. táblázat** A *C. albicans* törzsek (1-8. izolátum) MIC vizsgálatának eredményei a zavarosodás mértékének jelölésével, az egyes hígítások esetén

9. plate		2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	+	-
<i>C. albicans</i>	1.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>C. albicans</i>	2.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>C. albicans</i>	3.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>C. albicans</i>	4.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>C. albicans</i>	5.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>C. albicans</i>	6.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>C. albicans</i>	7.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>C. albicans</i>	8.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

### 5.3. Vitalitás vizsgálat eredményei

Az eredményekből jól látszik, hogy az elvárt legalább 50%-os életképesség csökkenést (EC<sub>50</sub>) csak egy esetben érte el a készítmény, ott is csak annak 1:1 arányú hígítása esetében. Ez a törzs egy *Salmonella* Typhimurium volt. A többi *Salmonella* spp. és *Escherichia coli* izolátum (**7. táblázat**), valamint *Enterococcus* spp. esetén nincs elfogadható mértékű életképesség csökkenés.

**7. táblázat** Az életképesség változása a pozitív kontrollhoz képest %-ban kifejezve

Ssz.	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x
1.	49	89	92	95	96	98	97	101	97	98
2.	89	111	117	112	110	114	113	115	113	112
3.	130	143	149	149	157	153	163	162	158	153
4.	140	150	140	147	161	162	167	167	166	152
5.	119	131	112	119	127	126	127	129	129	130
6.	120	163	152	149	160	163	158	168	175	167
7.	100	109	116	109	95	104	104	102	107	107
8.	98	112	121	115	108	109	110	109	109	106

1-4. *Salmonella* spp., 5-8. *Escherichia coli*

A *S. aureus* törzsek esetén a legtöbb esetben a 2x, 4x hígítások esetén volt megfigyelhető számottevő életképesség csökkenés, valamint a 13. törzs esetén volt a nagyobb hígítások esetén is jelentősebb mértékű az életképesség csökkenése, azonban ezek egyike sem érte el az elvárt EC<sub>50</sub> értéket (**8. táblázat**).

**8. táblázat** Az életképesség változása a pozitív kontrollhoz képest %-ban kifejezve

Ssz.	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x
9.	113	132	156	152	139	133	138	131	139	125
10.	86	111	116	123	116	122	108	108	97	93
11.	100	122	109	113	124	124	121	116	115	122
12.	98	94	94	103	126	78	115	58	56	119
13.	70	77	59	66	61	63	65	62	68	77
14.	76	92	105	115	106	112	109	108	106	108
15.	77	80	99	99	94	97	95	96	92	95
16.	94	96	94	89	96	97	99	102	90	103

9-12. *Enterococcus* spp., 13-16. *S. aureus*

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink során összetételét tekintve egy mentol, eukaliptusz, kakukkfű, kámfor, ajwain, bazsalikom és kurkuma illóolaj kivonatokat tartalmazó készítmény *in vitro* hatékonyságát teszteltük állat- és közegészségügyi szempontból fontos patogén mikroorganizmusokkal (*Salmonella* spp., *E. coli*, *Enterococcus* spp., *S. aureus* és *C. albicans*) szemben. Ennek során agardiffúziós és MIC-érték meghatározást végeztünk, majd életképesség szempontjából vitalitás vizsgálatot néztünk MTS-formazán segítségével.

Az agardiffúziós eredmények alapján a készítménynek a legkifejezettebb megfigyelhető antimikrobiális hatása *S. aureus* baktériumra nézve volt, a gátlási zóna átlaga 15,89 mm volt, 2,15 mm szórással. Alsalamah és mtsai. bazsalikom levele esetén 11,3±0,071 mm, magva esetén 8,0±0,212 mm és szára esetén 6,8±0,021 mm gátlási zónákat tapasztaltak [59], viszont de Souza Araújo és mtsai. eukaliptusz kivonat esetében 27 mm gátlási zóna átmérőt mértek [60], Mota és mtsai. pedig 90 mm gátlási zónát figyeltek meg [61]. Dedhia és mtsai. kurkuma esetén 0,0±0,0 mm gátlási zónát határoztak meg [62]. Shanaida és mtsai. kakukkfű esetén 31,0±0,20 mm gátlási zónát mértek [63], Dahiya és mtsai. pedig 21,0±0,1 mm gátlási zónát figyeltek meg [64], Demirci és mtsai. 13 mm gátlási zónát írtak le [65], Faleiro és mtsai. virágkivonat esetén 6,0±0,0 mm gátlási zónát mértek, levélkivonat esetén pedig 7,3±0,5 mm gátlási zónát mértek [66]. Gyenge hatás volt megfigyelhető *Enterococcus faecalis* esetén, a gátlási zóna átlaga 6,58 mm volt, 0,67 mm szórással. Shanaida és mtsai. kakukkfű esetén 19,0±1,0 mm gátlási zónát mértek [63].

*E. coli* esetén a gátlási zónák átlaga 5,17 (±1,27 SD) volt, Alsalamah és mtsai. bazsalikom levele esetén 9,87±2,99 mm, magva esetén 7,50±4,87 mm és szára esetén 5,93±1,93 mm gátlási zónákat állapítottak meg [59], azonban de Souza Araújo és mtsai. eukaliptusz kivonat esetében 20,2 mm gátlási zóna átmérőt mértek [60], Ameer és mtsai. csak 12,3±3,8 mm gátlási zónát figyeltek meg [67], Mota és mtsai. pedig 30 mm gátlási zónát tapasztaltak [61]. Shanaida és mtsai. kakukkfű esetén 30,0±1,0 mm gátlási zónát mértek [63], Dahiya és mtsai. pedig 13,0±0,52 mm gátlási zónát figyeltek meg [64], Faleiro és mtsai. virágkivonat esetén 6,6±1,1 mm gátlási zónát mértek, levélkivonat esetén pedig 9,6±1,5 mm gátlási zónát mértek [66]. *Pseudomonas aeruginosa* esetén a gátlási zónák átlaga 5,56 mm (±2,01 SD) volt, Alsalamah és mtsai. bazsalikom levele esetén 7,75±1,28 mm, magja esetén 7,00±1,51 mm és szára esetén 5,67±0,83 mm gátlási zónákat állapítottak meg [59], ezzel szemben de Souza Araújo és mtsai. eukaliptusz kivonat esetében 26,3 mm gátlási zóna átmérőt mértek [60], viszont Mota és mtsai. 0 mm gátlási zónát figyeltek

meg [61]. Demirci és mtsai. kakukkfű esetén 0 mm gátlási zónát írtak le [65]. *Salmonella* spp. esetén Mota és mtsai. 0 mm gátlási zónát figyeltek meg eukaliptusz olaja esetén [61]. Faleiro és mtsai. kakukkfű virágkivonat esetén  $8,6\pm 1,1$  mm gátlási zónát mértek, levélkivonat esetén pedig  $8,0\pm 1,0$  mm gátlási zónát figyeltek meg [66].

Szintén gyenge volt a megfigyelhető hatás *C. albicans* esetén, ahol a gátlási zóna átlaga 7,58 mm, szórása 1,00 mm volt. Ehhez képest de Souza Araújo és mtsai. eukaliptusz kivonat esetében 26 mm gátlási zóna átmérőt mértek [60], Mota és mtsai. pedig 50 mm gátlási zónát figyeltek meg [61]. Dedhia és mtsai. kurkuma esetén  $1,9\pm 0,8$  mm gátlási zónát határoztak meg [62]. Shanaida és mtsai. kakukkfű esetén  $23,0\pm 0,35$  mm gátlási zónát mértek [63], Faleiro és mtsai. virágkivonat esetén  $6,0\pm 0,0$  mm gátlási zónát mértek, levélkivonat esetén pedig  $8,3\pm 2,0$  mm gátlási zónát írtak le [66].

A mikrohígítási módszerrel végzett vizsgálatok során a készítmény 2x, 4x és 8x hígítása esetén tapasztaltunk mérsékelt zavarosodást (++) , az ennél nagyobb hígítások erős zavarosodást (+++) mutattak. A *Salmonella* spp. a három legkisebb hígítás mérsékeltebb zavarosodást mutatott. Iwinski és mtsai. egy kakukkfűvet tartalmazó készítmény különböző *Salmonella* szerovariánsokat vizsgálva a készítmény 256-512x hígítása esetén figyeltek meg baktericid hatást [68].

*E. coli* esetén a három legkisebb hígítás mérsékeltebb zavarosodást mutatott, egy törzs esetében tapasztaltunk enyhe zavarosodást, azonban ott is csak a 2x hígítás során. Lagha és mtsai.  $0,19-0,78$  µg/ml közötti MIC-értékeket mutattak ki kakukkfű esetén [69]. Ebani és mtsai. borsmenta esetén  $1,14$  µg/ml MIC-értéket figyeltek meg [70]. Mansouri és mtsai. kakukkfű esetén  $0,07-0,63$  µg/ml MIC-értéket írtak le hatékonynak brojlercsirkéből izolált törzseknél; pulykából izolált törzseknél szintén ugyanezt a tartományt figyelték meg [71], ugyanakkor Golestani és mtsai.  $62,5$  MIC-értéket határoztak meg [72]. Kurekci és mtsai. kutatásuk során eukaliptusz hatóanyagra  $>1024$  µg/ml MIC-értéket határoztak meg [73]. Chodkowska és mtsai. egy többek között kakukkfűvet és mentolt tartalmazó illóolajtartalmú készítményt vizsgálva annak 512x hígítása esetén figyeltek meg madárpatógén *E. coli* (APEC) törzsek és 256x hígítása esetén nem APEC törzsek esetén baktericid hatást [74].

Az *Enterococcus* törzsek hasonló módon csak a három legkisebb hígítás esetén mutattak mérsékelt zavarosodást. Liu és mtsai. vizsgálatuk során kakukkfű MIC-értékét  $512$  µg/ml koncentrációban határozták meg [75]. Kurekci és mtsai. kutatásuk során eukaliptusz esetén  $>1024$  µg/ml MIC-értéket állapítottak meg [73].

A készítmény legkifejezettebb hatása *S. aureus* esetén volt megfigyelhető, itt a 2x hígítás esetén enyhe zavarosodás volt megfigyelhető a legtöbb törzs esetén, egy törzs esetében a 4x hígításnál is megfigyeltük ezt, egy törzs esetén pedig az összes hígítás során enyhe zavarosodást tapasztaltunk. Xiao és mtsai. kakukkfű esetén 0,125 µg/ml MIC-értékeket írtak le [76]. A *C. albicans* gomba esetén szintén csak a készítmény három legkisebb hígítása során figyeltünk meg mérsékelt zavarosodást. Jafri és mtsai. kakukkfű esetén 1,56 µg/ml MIC-értéket figyeltek meg [77].

A vitalitás vizsgálat során egy *Salmonella* Typhimurium törzs esetén a készítmény legnagyobb vizsgált koncentrációja (1:1 arány hígítás) esetén volt megfigyelhető a kívánt EC<sub>50</sub> érték. Ezen kívül jelentős életképesség csökkenés volt megfigyelhető *S. aureus* törzsek esetén a 2x, 4x, 8x hígítások esetén és a 13. törzs további hígításai esetén is, azonban ezek egyike sem érte el az elfogadható EC<sub>50</sub> értéket. Kurekci és mtsai. kutatásuk során eukaliptusz esetén >1024 µg/ml MIC-értéket határozott meg [73]. Ebani és mtsai. borsmenta esetében 18,24 µg/ml MIC-értéket figyeltek meg, kámfor esetén pedig 0,63-1,26 µg/ml közötti értékeket írtak le [78].

Összességében elmondhatjuk tehát, hogy a készítmény önmagában nem mutat antimikrobiális hatást, azonban *Salmonella* Typhimurium esetén a legtöményebb koncentráció ígéretesnek bizonyulhat, ez alapján érdemes lehet ezzel a törzsszel *in vivo* konvencionális állatfertőzés mellett vizsgálni a készítmény hatékonyságát, ennek során mérni a súlygyarapodásra és a takarmányfogyasztásra gyakorolt hatását; ezen túlmenően pedig a *Salmonella* Typhimurium fertőzés megelőzésében, valamint annak ürítésére gyakorolt hatását is vizsgálni.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A globális szintre emelkedett antimikrobiális rezisztencia közös gondolkodásra sarkallja az állat- és közegészségügy területének szakembereit. Új, az antibiotikumokat részben vagy egészben kiváltani képes alternatív megoldásokra van szükség; ilyen alternatívaként jöhet szóba a növényi illóolajok használata. Kifejezetten igaz lehet ez az egyébként nagy mennyiségű antibiotikumot felhasználó, élelmiszertermelő állatokat tartó üzemekben.

Kutatásunk célja egy többféle növényi illóolaj kivonatokat (mentol, eukaliptusz, kakukkfű, kámfor, ajwain, bazsalikom és kurkuma) tartalmazó készítmény *in vitro* hatékonyságának tesztelése hagyományos agardiffúziós, valamint minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározás módszerével; az állat- és közegészségügyi szempontból is fontos fakultatív és obligát patogén baktériumtörzsek (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp.), valamint *Candida albicans* gombafajra nézve. Ezen kívül vizsgálatainkat vitális festési eljárással egészítettük ki.

Vizsgálataink során az agardiffúziós és mikrodilúciós vizsgálati módszerek hasonló eredményeket mutattak. A szaporodás gátlását leginkább *Staphylococcus* spp. izolátumok esetén tudta kifejteni a készítmény, az agardiffúziós gátlási zóna mérete  $15,89 \pm 2,15$  mm volt, a mikrohígításos módszer során a 2-8x hígítások esetén tapasztaltunk zavarosodás csökkenést. A többi fajnál a legtöményebb koncentrációknál volt tapasztalható nagyobb gátlási zóna átmérő (*Enterococcus faecalis*  $6,58 \pm 0,67$ ; *Escherichia coli*  $5,17 \pm 1,27$  mm; *Pseudomonas aeruginosa*  $5,56 \pm 2,01$  mm; *Candida albicans*  $7,58 \pm 1,00$  mm), illetve kisebb mértékű zavarosodást a táplevesben (2-8x hígítások). A készítmény egyetlen esetben sem tudta a baktériumok szaporodását teljes mértékben gátolni; így sem bakteriosztatikus, sem baktericid hatásról nem beszélhetünk. A vitalitás vizsgálatok során az 50%-os életképesség csökkenést (EC<sub>50</sub>) csak egy esetben – egyetlen *Salmonella* Typhimurium törzs esetében tapasztaltuk, ott is csak a készítmény 1:1 arányú hígítása esetében.

Összességében elmondhatjuk, hogy a készítmény ígéretes lehet *Staphylococcus aureus* okozta fertőzések, illetve *Salmonella* spp. okozta fertőzések kiegészítő terápiájában. Eredményeink alapján érdemes a készítményt további *in vivo*, konvencionális állatkísérletbe bevonni, különös tekintettel vizsgálni a *Salmonella* Typhimurium okozta fertőzés során az ürítés csökkentésére, valamint a súlygyarapodásra, a takarmányértékesítésre és a fajlagra gyakorolt hatásának vizsgálatát. Emellett érdemes lehet a vizsgálatokat kiegészíteni kórszövettani vizsgálatokkal. Az ilyen új alternatív antibiotikum terápiák vizsgálata az állat- és közegészségügy tükrében az Egy Egészség szemlélet fontos mozgatórugóit képezik.



## 8. SUMMARY

The issue of antimicrobial resistance, which has now reached a global level, is a common challenge for animal and public health professionals. New alternative solutions are needed to replace antibiotics in whole or in part, such as the use of plant essential oils. This may be particularly true in farms that use large values of antibiotics in food-producing (farm) animals.

The aim of our research is to test the *in vitro* efficacy of a preparation containing several plant essential oil extracts (menthol, eucalyptus, thyme, camphor, ajwain, basil and turmeric) by conventional agar diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) value determination against facultative and obligate pathogenic bacterial strains of animal and public health importance (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp.) and the fungal species *Candida albicans*. In addition, we complemented our studies with a vital staining procedure.

In our studies, conventional agar diffusion and microdilution methods gave similar results. Bacterial growth was most affected in *Staphylococcus* spp. isolates, with an inhibition zone size of  $15.89 \pm 2.15$  mm in agar diffusion and a reduction in turbidity in the microdilution method at 2-8x dilutions. For the other species, larger inhibition zone diameters (*Enterococcus faecalis*  $6.58 \pm 0.67$ ; *Escherichia coli*  $5.17 \pm 1.27$  mm; *Pseudomonas aeruginosa*  $5.56 \pm 2.01$  mm; *Candida albicans*  $7.58 \pm 1.00$  mm) and less turbidity in the broth (2-8x dilutions) were observed at the most concentrations. However, in none of the cases did the preparation completely inhibit bacterial growth; thus, neither bacteriostatic nor bactericidal effects can be considered. In the vitality tests, a 50% reduction in viability (EC50) was observed in only one case - a single strain of *Salmonella* Typhimurium, and then only at a 1:1 dilution of the preparation.

Overall, the product shows promise as an adjunctive therapy for infections caused by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Our results suggest that the product should be further tested *in vivo* in conventional animal studies, in particular to investigate its effect on reducing shedding during *Salmonella* Typhimurium infection, and its effects on weight gain, feed consumption and feed conversion ratio. In addition, it may be worthwhile to complement these studies with pathophysiology studies. The investigation of such new alternative antibiotic therapies is an important driver of the One Health approach in the context of animal and public health.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Frieri M, Kumar K, Boutin A (2017) Antibiotic resistance. *J Infect Public Health* 10:369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
2. Ghosh D, Veeraraghavan B, Elangovan R, Vivekanandan P (2020) Antibiotic Resistance and Epigenetics: More to It than Meets the Eye. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e02225-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02225-19>
3. Samreen null, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH (2021) Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist* 27:101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
4. Shallcross LJ, Howard SJ, Fowler T, Davies SC (2015) Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370:20140082. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0082>
5. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, Shah T, Chaudhry TH, Rasool MH, Shahid A, Xueshan X, Baloch Z (2021) Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol* 11:771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
6. Davies J, Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
7. Machowska A, Stålsby Lundborg C (2018) Drivers of Irrational Use of Antibiotics in Europe. *Int J Environ Res Public Health* 16:E27. <https://doi.org/10.3390/ijerph16010027>
8. Mboya EA, Sanga LA, Ngocho JS (2018) Irrational use of antibiotics in the Moshi Municipality Northern Tanzania: a cross sectional study. *Pan Afr Med J* 31:165. <https://doi.org/10.11604/pamj.2018.31.165.15991>
9. McEwen SA, Collignon PJ (2018) Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 6:. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
10. Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A (2018) Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules* 23:E795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
11. Dodds DR (2017) Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochem Pharmacol* 134:139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.005>
12. Hosain MZ, Kabir SML, Kamal MM (2021) Antimicrobial uses for livestock production in developing countries. *Vet World* 14:210–221. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.210-221>
13. Ben Y, Fu C, Hu M, Liu L, Wong MH, Zheng C (2019) Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environ Res* 169:483–493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>

14. Bartkiene E, Ruzauskas M, Bartkevics V, Pugajeva I, Zavistanaviciute P, Starkute V, Zokaityte E, Lele V, Dauksiene A, Grashorn M, Hoelzle LE, Mendybayeva A, Ryshyanova R, Gruzauskas R (2020) Study of the antibiotic residues in poultry meat in some of the EU countries and selection of the best compositions of lactic acid bacteria and essential oils against *Salmonella enterica*. *Poult Sci* 99:4065–4076. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.002>
15. Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C, Domig KJ (2019) The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poult Sci* 98:1791–1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
16. (2003) Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance)
17. Bloomfield SF (2002) Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. *J Appl Microbiol* 92 Suppl:144S–57S
18. Pinto Jimenez CE, Keestra S, Tandon P, Cumming O, Pickering AJ, Moodley A, Chandler CIR (2023) Biosecurity and water, sanitation, and hygiene (WASH) interventions in animal agricultural settings for reducing infection burden, antibiotic use, and antibiotic resistance: a One Health systematic review. *Lancet Planet Health* 7:e418–e434. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00049-9)
19. Wang C-H, Hsieh Y-H, Powers ZM, Kao C-Y (2020) Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era. *Int J Mol Sci* 21:E1061. <https://doi.org/10.3390/ijms21031061>
20. Wang W, Li D, Huang X, Yang H, Qiu Z, Zou L, Liang Q, Shi Y, Wu Y, Wu S, Yang C, Li Y (2019) Study on Antibacterial and Quorum-Sensing Inhibition Activities of *Cinnamomum camphora* Leaf Essential Oil. *Molecules* 24:E3792. <https://doi.org/10.3390/molecules24203792>
21. Parham S, Kharazi AZ, Bakhsheshi-Rad HR, Nur H, Ismail AF, Sharif S, RamaKrishna S, Berto F (2020) Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials. *Antioxidants (Basel)* 9:E1309. <https://doi.org/10.3390/antiox9121309>
22. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A (2019) Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative? *Molecules* 24:E2130. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>
23. Zarei Yazdeli M, Ghazaei C, Tasallot Maraghi E, Bakhshi A, Shukohifar M (2021) Evaluation of Antibacterial Synergism of Methanolic Extract of *Dracocephalum kotschyi* and *Trachyspermum ammi*. *Malays J Med Sci* 28:64–75. <https://doi.org/10.21315/mjms2021.28.6.7>
24. Kozics K, Bučková M, Puškárová A, Kalászová V, Cabicarová T, Pangallo D (2019) The Effect of Ten Essential Oils on Several Cutaneous Drug-Resistant Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. *Molecules* 24:E4570. <https://doi.org/10.3390/molecules24244570>

25. Sakkas H, Papadopoulou C (2017) Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J Microbiol Biotechnol* 27:429–438. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>
26. Stevanović ZD, Bošnjak-Neumüller J, Pajić-Lijaković I, Raj J, Vasiljević M (2018) Essential Oils as Feed Additives-Future Perspectives. *Molecules* 23:E1717. <https://doi.org/10.3390/molecules23071717>
27. Liu F, Jin P, Gong H, Sun Z, Du L, Wang D (2020) Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis*. *Poult Sci* 99:5127–5136. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.067>
28. Kon K, Rai M (2012) Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. *Nusantara Bioscience* 4:. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n040202>
29. Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia AT, Horhat FG (2014) *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J Med Life* 7 Spec No. 3:56–60
30. Arasu A, Pingley V, Prabha N, O V R, Annathurai K, Kasirajan S, Govindasamy A, Alwahibi MS, Elshikh MS, Abdel Gawwad MR, Arockiaraj J (2021) Impact and fungitoxic spectrum of *Trachyspermum ammi* against *Candida albicans*, an opportunistic pathogenic fungus commonly found in human gut that causes Candidiasis infection. *J Infect Public Health* 14:1854–1863. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.09.027>
31. Ebadollahi A, Jalali Sendi J, Setzer WN, Changbunjong T (2022) Encapsulation of *Eucalyptus largiflorens* Essential Oil by Mesoporous Silicates for Effective Control of the Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Molecules* 27:3531. <https://doi.org/10.3390/molecules27113531>
32. Gupta P, Preet S, Ananya, Singh N (2022) Preparation of *Thymus vulgaris* (L.) essential oil nanoemulsion and its chitosan encapsulation for controlling mosquito vectors. *Sci Rep* 12:4335. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07676-5>
33. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Saad AM, Salem HM, Ashry NM, Abo Ghanima MM, Shukry M, Swelum AA, Taha AE, El-Tahan AM, AbuQamar SF, El-Tarabily KA (2022) Essential oils and their nanoemulsions as green alternatives to antibiotics in poultry nutrition: a comprehensive review. *Poult Sci* 101:101584. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101584>
34. Ebani VV, Mancianti F (2020) Use of Essential Oils in Veterinary Medicine to Combat Bacterial and Fungal Infections. *Vet Sci* 7:E193. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040193>
35. Soni R, Sharma G, Jasuja ND (2016) Essential Oil Yield Pattern and Antibacterial and Insecticidal Activities of *Trachyspermum ammi* and *Myristica fragrans*. *Scientifica (Cairo)* 2016:1428194. <https://doi.org/10.1155/2016/1428194>
36. Ebani VV, Najar B, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F, Nardoni S (2018) Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial Efficacy of Sixteen Essential Oils against

- Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* Isolated from Poultry. *Vet Sci* 5:E62. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030062>
37. Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F (2018) Antimicrobial Activity of Five Essential Oils against Bacteria and Fungi Responsible for Urinary Tract Infections. *Molecules* 23:E1668. <https://doi.org/10.3390/molecules23071668>
  38. Samoilă NR, Gaceu L (2019) Comparative Study Regarding the Antimicrobial Activity of Eucalyptus, Mentha Piperita and Hippophae Rhamnoides – A Review
  39. Wang L, Zhang K, Zhang K, Zhang J, Fu J, Li J, Wang G, Qiu Z, Wang X, Li J (2020) Antibacterial Activity of Cinnamomum camphora Essential Oil on *Escherichia coli* During Planktonic Growth and Biofilm Formation. *Front Microbiol* 11:561002. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561002>
  40. Camele I, Gruľová D, Elshafie HS (2021) Chemical Composition and Antimicrobial Properties of Mentha × piperita cv. “Kristinka” Essential Oil. *Plants (Basel)* 10:1567. <https://doi.org/10.3390/plants10081567>
  41. Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C (2017) Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiologyopen* 6:. <https://doi.org/10.1002/mbo3.459>
  42. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K (2014) A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int* 2014:186864. <https://doi.org/10.1155/2014/186864>
  43. Gunasegaran T, Rathinam X, Kasi M, Sathasivam K, Sreenivasan S, Subramaniam S (2011) Isolation and identification of salmonella from curry samples and its sensitivity to commercial antibiotics and aqueous extracts of *Camelia sinensis* (L.) and *Trachyspermum ammi* (L.). *Asian Pac J Trop Biomed* 1:266–269. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60040-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60040-3)
  44. Sienkiewicz M, Łysakowska M, Pastuszka M, Bienias W, Kowalczyk E (2013) The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules* 18:9334–9351. <https://doi.org/10.3390/molecules18089334>
  45. Grădinaru AC, Trifan A, Șpac A, Brebu M, Miron A, Aprotosoiaie AC (2018) Antibacterial activity of traditional spices against lower respiratory tract pathogens: combinatorial effects of *Trachyspermum ammi* essential oil with conventional antibiotics. *Lett Appl Microbiol* 67:449–457. <https://doi.org/10.1111/lam.13069>
  46. Yu Y, Dong J, Wang Y, Gong X (2021) RNA-seq analysis of antibacterial mechanism of *Cinnamomum camphora* essential oil against *Escherichia coli*. *PeerJ* 9:e11081. <https://doi.org/10.7717/peerj.11081>
  47. Pham VH, Kan L, Huang J, Geng Y, Zhen W, Guo Y, Abbas W, Wang Z (2020) Dietary encapsulated essential oils and organic acids mixture improves gut health in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *J Anim Sci Biotechnol* 11:18. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0421-y>

48. Zhu Q, Sun P, Zhang B, Kong L, Xiao C, Song Z (2021) Progress on Gut Health Maintenance and Antibiotic Alternatives in Broiler Chicken Production. *Front Nutr* 8:692839. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.692839>
49. Bona E, Cantamessa S, Pavan M, Novello G, Massa N, Rocchetti A, Berta G, Gamalero E (2016) Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *J Appl Microbiol* 121:1530–1545. <https://doi.org/10.1111/jam.13282>
50. Asadi N, Husseini SD, Tohidian M-T, Abdali N, Mimandipoure A, Rafieian-Kopaei M, Bahmani M (2017) Performance of Broilers Supplemented With Peppermint (*Mentha piperita* L.) Powder. *J Evid Based Complementary Altern Med* 22:703–706. <https://doi.org/10.1177/2156587217700771>
51. Mohebodini H, Jazi V, Ashayerizadeh A, Toghyani M, Tellez-Isaias G (2021) Productive parameters, cecal microflora, nutrient digestibility, antioxidant status, and thigh muscle fatty acid profile in broiler chickens fed with *Eucalyptus globulus* essential oil. *Poult Sci* 100:100922. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.020>
52. Diarra MS, Malouin F (2014) Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front Microbiol* 5:282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00282>
53. Ahmadian A, Seidavi A, Phillips CJC (2020) Growth, Carcass Composition, Haematology and Immunity of Broilers Supplemented with Sumac Berries (*Rhus coriaria* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris*). *Animals (Basel)* 10:E513. <https://doi.org/10.3390/ani10030513>
54. Xue F, Shi L, Li Y, Ni A, Ma H, Sun Y, Chen J (2020) Effects of replacing dietary Aureomycin with a combination of plant essential oils on production performance and gastrointestinal health of broilers. *Poult Sci* 99:4521–4529. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.030>
55. Adewole DI, Oladokun S, Santin E (2021) Effect of organic acids-essential oils blend and oat fiber combination on broiler chicken growth performance, blood parameters, and intestinal health. *Anim Nutr* 7:1039–1051. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.02.001>
56. Park JH, Kim IH (2018) Effects of a protease and essential oils on growth performance, blood cell profiles, nutrient retention, ileal microbiota, excreta gas emission, and breast meat quality in broiler chicks. *Poult Sci* 97:2854–2860. <https://doi.org/10.3382/ps/pey151>
57. Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y (2015) In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J Anim Sci Biotechnol* 6:58. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0055-7>
58. b334d107-21f5-7850-c4cc-0aa1ce7941b0.pdf
59. Alsalamah S, Algonuim MI, Basher N, Sulieman AME (2022) Assessment of The Antibacterial Susceptibility of *Ocimum basilicum*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 68:96–101. <https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.8.17>

60. de Souza Araújo E, Pimenta AS, Feijó FMC, Castro RVO, Fasciotti M, Monteiro TVC, de Lima KMG (2018) Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. *J Appl Microbiol* 124:85–96. <https://doi.org/10.1111/jam.13626>
61. Mota V de S, Turrini RNT, Poveda V de B (2015) [Antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* oil, xylitol and papain: a pilot study]. *Rev Esc Enferm USP* 49:216–220. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420150000200005>
62. Dedhia J, Mukharjee E, Luke AM, Mathew S, Pawar AM (2018) Efficacy of *Andrographis paniculata* compared to *Azadirachta indica*, *Curcuma longa*, and sodium hypochlorite when used as root canal irrigants against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*: An in vitro antimicrobial study. *J Conserv Dent* 21:642–645. [https://doi.org/10.4103/JCD.JCD\\_118\\_18](https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_118_18)
63. Shanaida M, Hudz N, Białoń M, Kryvtsowa M, Svydenko L, Filipka A, Paweł Wiczorek P (2021) Chromatographic profiles and antimicrobial activity of the essential oils obtained from some species and cultivars of the *Menthaeae* tribe (*Lamiaceae*). *Saudi J Biol Sci* 28:6145–6152. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.068>
64. Dahiya P, Purkayastha S (2012) Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates. *Indian J Pharm Sci* 74:443–450. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.108420>
65. Demirci F, Karaca N, Tekin M, Demirci B (2018) Anti-inflammatory and antibacterial evaluation of *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* essential oil against rhinosinusitis pathogens. *Microb Pathog* 122:117–121. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.025>
66. Faleiro ML, Miguel MG, Ladeiro F, Venâncio F, Tavares R, Brito JC, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (2003) Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett Appl Microbiol* 36:35–40. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01259.x>
67. Ameer E, Sarra M, Yosra D, Mariem K, Nabil A, Lynen F, Larbi KM (2021) Chemical composition of essential oils of eight Tunisian *Eucalyptus* species and their antibacterial activity against strains responsible for otitis. *BMC Complement Med Ther* 21:209. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03379-y>
68. Iwiński H, Wódz K, Chodkowska K, Nowak T, Róžański H (2022) In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytochemicals Mixture on *Salmonella* spp. Isolated from Chicken Broiler. *Antibiotics* (Basel) 11:868. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070868>
69. Lagha R, Ben Abdallah F, Al-Sarhan BO, Al-Sodany Y (2019) Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules* 24:1161. <https://doi.org/10.3390/molecules24061161>
70. Ebani VV, Najjar B, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F, Nardoni S (2018) Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial Efficacy of Sixteen Essential Oils against

- Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* Isolated from Poultry. *Vet Sci* 5:E62. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030062>
71. Mansouri N, Aoun L, Dalichaouche N, Hadri D (2018) Yields, chemical composition, and antimicrobial activity of two Algerian essential oils against 40 avian multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. *Vet World* 11:1539–1550. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1539-1550>
  72. Golestani MR, Rad M, Bassami M, Afkhami-Goli A (2015) Analysis and evaluation of antibacterial effects of new herbal formulas, AP-001 and AP-002, against *Escherichia coli* O157:H7. *Life Sci* 135:22–26. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.05.007>
  73. Kurekci C, Bishop-Hurley SL, Vercoe PE, Durmic Z, Al Jassim RAM, McSweeney CS (2012) Screening of Australian plants for antimicrobial activity against *Campylobacter jejuni*. *Phytother Res* 26:186–190. <https://doi.org/10.1002/ptr.3526>
  74. Chodkowska KA, Iwiński H, Wódz K, Nowak T, Róžański H (2022) In Vitro Assessment of Antimicrobial Activity of Phytobiotics Composition towards of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and Other *E. coli* Strains Isolated from Broiler Chickens. *Antibiotics (Basel)* 11:1818. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121818>
  75. Liu F, Jin P, Gong H, Sun Z, Du L, Wang D (2020) Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis*. *Poult Sci* 99:5127–5136. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.067>
  76. Xiao S, Cui P, Shi W, Zhang Y (2020) Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Med Ther* 20:99. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02898-4>
  77. Jafri H, Ahmad I (2020) *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Mycol Med* 30:100911. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100911>
  78. Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Tosi G, Massi P, Pistelli L, Mancianti F (2019) In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils Against *Salmonella enterica* Serotypes Enteritidis and Typhimurium Strains Isolated from Poultry. *Molecules* 24:E900. <https://doi.org/10.3390/molecules24050900>



## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom az Állatorvostudományi Egyetem Gyógyszertani és Méregtani Tanszékének, amely lehetőséget és feltételeket biztosított a tudományos diákköri munkám elkészítéséhez.

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Kerek Ádámnak és Dr. Kovács Lászlónak, hogy mind szakmailag, mind emberileg segítséget nyújtottak a dolgozat megírása és az azt megelőző kutatómunka ideje alatt.

Köszönöm Berényi Ágnesnek rendíthetetlen kitartását, aki az egyetem keretein kívül nyújtott támogatást, biztosítva a vizsgált gyógynövénykeveréket, elősegítve az együttműködést a Magyar Agár- és Élettudományi Egyetemmel.

Köszönettel tartozom Dr. Csitári Gábor egyetemi docensnek, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campus Takarmányozástani és Takarmányozás-élettani Tanszék munkatársának, aki az agardiffúziós táptalajjal történő vizsgálatok kivitelezésében járult hozzá a dolgozat összeállításában.

Az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

## Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Nagy Dominika**, **hatodik** évfolyamos hallgató „*Gyógynövénykivonatokat tartalmazó készítmény antibakteriális hatékonyságának in vitro meghatározása*” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023. október hó ... nap.

.....

Dr. Kerek Ádám  
témavezető

## Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kovács László**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Nagy Dominika**, **hatodik** évfolyamos hallgató „*Gyógynövénykivonatokat tartalmazó készítmény antibakteriális hatékonyságának in vitro meghatározása*” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023. október hó ... nap.

.....

Dr. Kovács László  
témavezető