Illóolajok és komponenseik kölcsönhatásának, valamint antibakteriális tulajdonságának vizsgálata légúti megbetegedést okozó baktériumtörzseken

Doktori (Ph.D.) értekezés

dr. Ács Kamilla

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Biológiailag aktív anyagok izolálása és vizsgálata alprogram

Programvezető: Prof. Dr. Deli József

Témavezető:

Dr. Horváth Györgyi Ph.D.

egyetemi docens

Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar

Farmakognóziai Intézet

Pécs

2018

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4
2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK 5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 8
3.1 A bakteriális légúti fertőzések jelentősége 8
3.2 Az illóolajok általános jellemzése 10
3.2.1 Az illóolajok fizikai-kémiai jellemzése 10
3.2.2 A vizsgálatok során alkalmazott illóolajok bemutatása 11
3.2.2.1 A fahéjkéregolaj 11
3.2.2.2 A szegfűszegolaj 12
3.2.2.3 A kakukkfűolaj 13
3.2.2.4 Az eukaliptuszolaj 13
3.2.2.5 A citronellaolaj 14
3.2.2.6 A borsmentaolaj 14
3.2.2.7 Az erdeifenyő olaj 15
3.2.2.8 Az *Artemisia adamsii* Besser illóolaja 16
3.2.3 Illóolajok antibakteriális hatása légúti kórokozók ellen 16
3.3 Az antimikrobás hatás *in vitro* vizsgálómódszerei 18
3.3.1 Korongdiffúziós módszerek 19
3.3.2 Dilúciós módszerek 19
3.3.3 Bioautográfiás vizsgálatok 20
3.3.4 Gőzteres vizsgálómódszerek 21
3.4. Illóolajok és illóolaj-komponensek kölcsönhatása 22
3.4.1 A kölcsönhatások *in vitro* vizsgáló módszerei 23
3.4.2 Illóolajok és illóolaj-komponensek kombinációja az iparban 24
3.4.3 Illóolajok és illóolaj-komponensek kombinációja a gyógyászatban 26
4. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 31
4.1 A vizsgálatok során alkalmazott illóolajok 31
4.2 Analitikai vizsgálatok 31
4.2.1 A gázkromatográfiás analízis paraméterei 31
4.2.2 Statikus gőztéranalízis szilárd fázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME) 33
4.3 Illóolajok antibakterális hatásának vizsgálata 34

4.3.1 A vizsgált mikroorganizmusok áttekintése 34
4.3.1.1 Meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* 34
4.3.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*, multirezisztens *P. aeruginosa* 35
4.3.1.3 *Streptococcus pyogenes, S. pneumoniae, S. mutans* 36
4.3.1.4 *Moraxella catarrhalis* 38
4.3.1.5 *Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae* 38
4.3.2. Tesztbaktériumok antibiotikum érzékenységének meghatározása 40
4.3.3 Az antibakteriális hatás *in vitro* vizsgálómódszerei 40
4.3.3.1 Direkt bioautográfiás vizsgálatok 40
4.3.3.2 A csőhígítás módszere 42
4.3.3.3 A vapor phase technika paraméterei 43
4.4 Illóolajok és illó komponenseik kölcsönhatásának vizsgálata 44
4.4.1. A direkt bioautográfiás módszer vizsgálati körülményei 44
4.4.1.1. Mikrobiológiailag aktív komponensek meghatározása 45
4.4.1.2. Minimális detektálható dózis meghatározása 45
4.4.1.3. A kölcsönhatást vizsgáló módszer paraméterei 46
4.4.2. Statisztikai analízis 46
4.4.3 A checkerboard-titrálás vizsgálati körülményei 47
4.4.3.1. MIC értékek meghatározása 47
4.4.3.2. A checkerboard-titrálás paraméterei 48
5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK 49
5.1 Az *A. adamsii* illóolaj-tartalmának meghatározása 49
5.2 Az analitikai vizsgálatok eredményei 49
5.2.1 A GC-FID és GC-MS analízis eredményei 49
5.2.2 Az sHS-SPME-GC-MS eredményei 52
5.3 Tesztbaktériumok antibiotikum érzékenységének értékelése 56
5.4 Az illóolajok antibakteriális hatásának értékelése 57
5.4.1 Direkt bioautográfiás vizsgálatok 57
5.4.2 A csőhígítás módszerének eredményei 61
5.4.3 A vapor phase technika eredményei 66
5.5 Illóolajok és illó-komponenseik kölcsönhatásanak értékelése 70
5.5.1. A direkt bioautográfiás vizsgálatok eredményei 70
5.5.1.1 Aktív illóolaj-komponensek kimutatása, minimális detektálható dózisuk meghatározása 71

5.5.1.2 Illóolaj-komponensek kölcsönhatásának értékelése....72
5.5.2 A checkerboard-titrálás eredményei 74
6. ÖSZEFOGLALÁS 76
7. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE 80
8. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK 97
8.1 Az értekezés alapját képező publikációk 97
8.2 Egyéb publikációk....97
8.3 Konferencia absztraktok 98
8.3.1 Konferencia előadások absztraktja....98
8.3.2 Poszter prezentációk absztraktjai 99
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 101
10. MELLÉKLETEK 102

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATCC: American Type Culture Collection (amerikai típustörzs gyűjtemény)

CFU: colony forming unit (telepképző egységek száma)

CA-MRSA: community-acquired MRSA (közösségben szerzett MRSA)

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinikai és Laboratóriaumi Standardok Intézete)

DMSO: dimetil-szulfoxid

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (német törzstípus gyűjtemény)

ESBL: extended-spectrum beta-lactamase (kiterjedt-spektrumú β-laktamáz)

FIC: fractional inhibitory concentration (frakcionális gátló koncentráció)

FICI: fractional inhibitory concentration index (frakcionális gátló koncentráció index)

FoNo: Formulae Normales (Szabványos Vényminták)

GC-ITMS: gas chromatography – ion-trap mass spectrometry (gázkromatográfia – ion csapda tömegspektrometriás detektálással)

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

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

HCA-MRSA: health care-acquired MRSA (egészségügyi intézményben szerzett MRSA)

MDD: minimális detektálható dózis

MHA: Müller-Hinton agar

MIC: minimum inhibitory concentration (minimális gátló koncentráció)

MBC: minimum bactericidal concentration (minimális baktericid koncentráció)

MRSA: meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*

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

NTHi: non-typeable *Haemophilus influenzae* (nem tipizálható *H. influenzae*)

PBP: penicillin binding protein (penicillinkötő fehérje)

sHS-SPME: static headspace – solid phase microextraction (statikus gőztéranalízis szilárd fázisú mikroextrakcióval)

R-*P. aeruginosa*: antibiotikum-rezisztens *P. aeruginosa*

SD: standard deviation (szórás)

ZOI: zone of inhibition (gátlási zóna)

2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A légúti megbetegedések az ősztől késő tavaszig terjedő időszakban kialakuló, csaknem minden életkort érintő, az orvosi gyakorlat számára sokszor nehezen kezelhető kórképek. Az elsődleges fertőzések hátterében vírusok, baktériumok és gombák egyaránt állhatnak, ezenfelül további problémát jelent az igen gyakori bakteriális felülfertőződés veszélye is. Napjainkban a hatékony terápia megtalálását nagyban nehezítik az elmúlt évek nem megfelelő, illetve túlzott antibakteriális terápiának köszönhetően az egyre nagyobb számban megjelenő rezisztens törzsek. A klasszikus antibiotikumok ennek következtében sok esetben csökkent hatékonysággal rendelkeznek, nem ritkán teljesen hatástalanokká válnak a korábban még érzékeny törzsek esetén is. Az egészségügy részéről ezért folyamatos igény mutatkozik olyan új terápiás lehetőségek és hatóanyagok felfedezésére, amelyek kiegészítve, vagy akár helyettesítve az antibakteriális terápiát fel tudják venni a harcot az ellenálló mikrobákkal szemben.

Az illóolajok komplex összetételű, hidrofób növényi anyagok, amelyek antimikrobás hatása már régóta ismert és alkalmazott a gyógyászatban. Illékony karakterükből adódóan inhaláció útján könnyen lejutnak a légutakba, komplex összetételüknek köszönhetően több támadásponton képesek a baktériumok elpusztítására. Manapság a betegek részéről tapasztalt nagy érdeklődés a természetes gyógymódok és gyógynövények iránt fokozottan indokolttá teszi ezen lehetőségek részletesebb megismerését a gyakorló szakemberek számára is. Számos vény nélkül kapható gyógyszerben, valamint a Szabványos Vényminták gyűjteményben (FoNo VII. 2003) szereplő légúti indikációjú készítmény hatóanyagaként fordulnak elő, így mindenképpen érdemes figyelmet szentelnünk rájuk, mint az antibakteriális terápia lehetséges alternatíváinak. Fontos kiemelni azonban, hogy az illóolajok döntő többségének használata tradícionális felhasználáson alapul, így sok esetben nem rendelkezünk elegendő adattal pontos hatásuk, adagolásuk illetve biztonságos alkalmazásuk tekintetében.

Bár az illóolajok antimikrobás hatásának értékelése számos kutatás alapját képezte az elmúlt évtized során, a vizsgálatok a klasszikus antimikrobás vizsgálómódszerek alkalmazásával főként az illóolaj folyékony halmazállapotban történő vizsgálatára irányultak. A módszerek többsége eredményes detektálást tesz lehetővé, azonban a kísérletek tervezésénél minden esetben figyelembe kell venni az illóolajok fizikai-kémiai paramétereit. Ezenfelül nem szabad elhanyagolni azt a tényt sem, hogy ezek a módszerek

nem standardizáltak, így az egyes kutatásokban leírt vizsgálati körülmények eltérései, valamint a meghatározott értékek egymással nehezen összevethetők.

Az illóolajok gyógyászati alkalmazása elsősorban inhaláció révén valósul meg, amely során a meghatározott hőmérsékleten képződött gőztér illékony komponensei fejtik ki hatásukat egy adott területre. Az olaj tehát folyékony állapotban közvetlenül nem érintkezik a kezelendő felülettel. Ezt a technikát modellezi legjobban az *in vitro* körülmények között megvalósítható gőzteres (vapor phase) módszer, amelynek alkalmazásával ez idáig elsősorban élelmiszerpatogén törzsek és illóolajok kapcsolatát vizsgálták döntő többségben. Jelenleg kevés vizsgálat áll rendelkezésünkre, amelyekben légúti baktériumok bevonásával alkalmazták volna ezt a technikát.

A rezisztens baktériumok kezelési nehézségei esetén az új terápiás alternatívák felkutatása mellett lehetőséget nyújthat a már bizonyítottan aktív anyagok egymással és egyéb szerekkel való kombinációja, ezáltal az antibateriális hatáserősségük fokozása. Ennek megfelelően az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb kutatási népszerűségnek örvend az illóolajok és komponenseik egymással, valamint klasszikus antimikrobás szerekkel történő kombinációja, azok kölcsönhatásának feltérképezése különböző patogének esetében. Az eddigi eredményeket áttekintve az említett terület igen ígéretesnek mutatkozik, kiemelendő azonban, hogy légúti patogénekre vonatkozólag ez idáig csak korlátozott számban végeztek ilyen irányú vizsgálatokat.

A fent említettek alapján kutatásunk célja volt:

- Néhány kereskedelmi forgalomban beszerezhető illóolaj (kakukkfű, szegfűszeg, fahéjkéreg, borsmenta, citronella, eukaliptusz, erdeifenyő), valamint egy Mongóliában honos illóolaj-tartalmú gyógynövény (*Artemisia adamsii* Besser) antimikrobás hatásának értékelése légúti kórokozók ellen.
- Az illóolajok és az általuk kialakított gőztér kémiai összetételének meghatározása GC-FID, GC-MS és sHS-SPME-GC-MS módszerekkel.
- A klasszikus *in vitro* csőhígítás módszer alkalmazása mellett törekedtünk az illóolajok természetének leginkább megfelelő, valamint az inhaláltatás körülményeit legjobban modellező módszerekkel is tesztelni mintáinkat. Ezért direkt bioautográfiás, valamint gőzteres technika segítségével is vizsgáltuk olajainkat légúti megbetegedéseket kiváltó baktériumokkal szemben.
- A vizsgálatok kivitelezése során célunk volt a módszerek bizonyos mértékű összevetése is annak érdekében, hogy megállapítsuk, az adott illóolaj folyékony

állapotban közvetlenül, vagy az illékony komponensek által kialakított gőztér segítségével tud hatékonyabb antibakteriális hatást kifejteni.

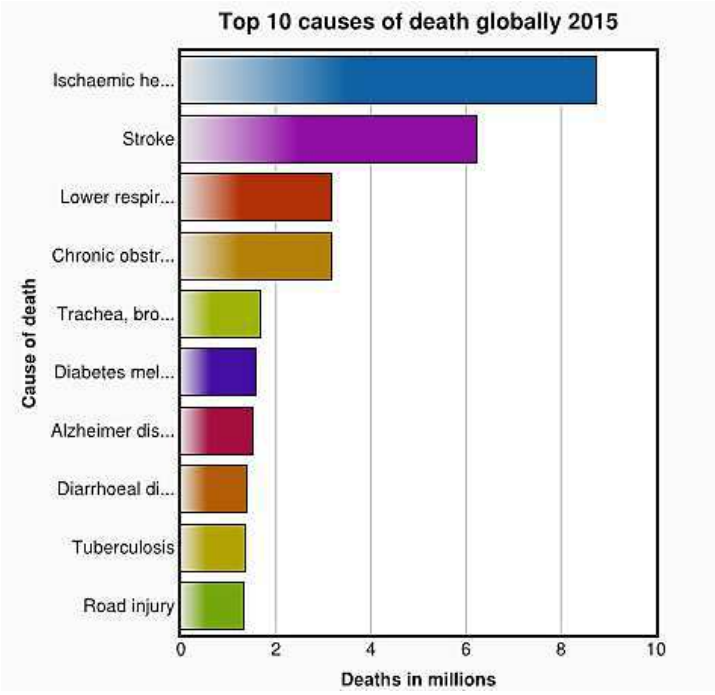
- Végül az antibakteriális hatás vizsgálata során eredményes illóolajokból és komponenseikből összeállított kombinációk hatékonyságát több tesztrendszerben (bioautográfia és checkerboard) is vizsgáltuk, fókuszálva a légutakban előforduló rezisztens baktériumtörzsekre.

A vizsgálatokba bevont illóolajokat előkísérletek és gyakorlati felhasználás alapján választottuk ki. Az előkísérletek nem voltak részei a jelenlegi PhD disszertációnak. A vizsgálatok eredményei véleményünk szerint az illóolajok terápiás felhasználásának bővíthetősége mellett hiteles információként szolgálhatnak a gyakorló szakemberek és betegek számára, ezenfelül a gyógyszerfejlesztés szempontjából is előnyösek lehetnek a légúti megbetegedés kezelésére alkalmas új készítmények tervezése során.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A bakteriális légúti fertőzések jelentősége

A légúti megbetegedések a szinte egész évben előforduló minden korcsoportot érintő betegségek körébe tartoznak. Bár kezelésük a gyakorló orvosok, klinikusok számára rutin feladatnak tűnhet, a terápiát nagyban akadályozza az immunszupresszált populáció növekedése, illetve a betegséget kiváltó baktériumok egyre rezisztensebbé válása a klasszikus antibakteriális szerekkel szemben. A WHO 2015-ös évet tekintő felmérése szerint az alsó légúti megbetegedések 3,2 millió halálesetet okoztak világszerte, meghaladva ezzel a diabéteszben és balesetben elhalálozottak számát (1. ábra).



1. ábra A tíz vezető halálok a világ össznépességét tekintve 2015-ben (WHO, 2015)

A légúti fertőzéseket kiváltó ágensek legtöbbször vírusok, gyakoriak azonban a vírusinfekciók mellett kialakuló másodlagos bakteriális felülfertőzések is. Bár a légutakhoz tartozó garat igen gazdag normál flórával rendelkezik, amely potenciális patogéneket is tartalmazhat, ezek általában a szervezet más részein okoznak fertőzéseket. A légutakból a véráramba és nyirokutakba kerülve majd a légutak egyéb részein megtelepedve azonban komolyabb fertőzéseket eredményezhetnek (pl. *Streptococcus pneumoniae* - középfülgyulladás, *Neisseria meningitidis* - központi idegrendszeri kórképek, *Haemophilus*

influenzae - alsó légúti fertőzések, *Staphylococcus aureus* - véráram fertőzései, valamint különféle gennyel járó kórképek) (Pál 2013). Elsődleges vagy másodlagos fertőzés esetén amennyiben bakteriális ok áll a háttérben, kiemelten fontos ismernünk a kórokozót, valamint annak antibiotikum-érzékenységét a megfelelő terápia kiválasztásának érdekében. A terápiás kezelés során elsődleges szempont a viszonylag szűkebb spektrumú szer kiválasztása, ezért az érintett területekből vett minta mikrobiológiai diagnosztikája sokszor elengedhetetlen a pontos diagnózishoz (Müller 2015). A légúti fertőzések leggyakoribb kiváltó ágenseit a teljesség igénye nélkül az 1. táblázat szemlélteti. A diagnózist nehezítheti a normál flóra és a kórkép kiváltásáért felelős baktériumok elkülönítése is.

1. táblázat Az alsó- és felső légúti infekciók leggyakoribb kiváltó ágensei (Pál 2013)

Alsó légúti infekciók	***Felső légúti infekciók***
Vírusok:	**Vírusok:**
Adenovírus Influenza- és Parainfluenza vírus Rhinovírus Coronavírus Respiratory syncytial vírus (RSV)	Rhinovírus Coronavírus Adenovírus Coxsackie A Respiratory syncytial vírus (RSV) Epstein-Barr vírus (EBV)
Baktériumok:	**Baktériumok:**
S. pneumoniae *H. influenzae* *H. influenzae b* *Moraxella catarrhalis* *Mycoplasma pneumoniae* *Chlamydophila pneumoniae* *S. aureus,* MRSA *Pseudomonas aeruginosa*	*Streptococcus pyogenes* *S. pneumoniae* *S. aureus* *H. influenzae* *Moraxella catarrhalis*

A különböző rezisztencia-mechanizmusok terjedésének, illetve a nem megfelelő antibiotikum terápiának köszönhetően a klasszikus antimikrobás szerekkel szemben egyre több Gram-pozitív (pl. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) és Gram-negatív (pl. *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*) baktérium válik csökkent érzékenységűvé, illetve rezisztenssé (Kon és Rai 2013).

Fekvőbeteg intézményben kezelt immunszupresszált betegek estén még inkább fokozott körültekintéssel kell lenni a multirezisztens kórokozókkal való fertőzés kialakulásának lehetőségére (pl. meticillin- és vankomicin-rezisztens *S. aureus* (MRSA, VRSA), illetve ESBL termelő *Klebsiella pneumoniae*) (Pál 2013).

A fent említettek tükrében a már meglévő gyógyszerek mellett az egészségügy részéről folyamatos az igény új terápiás alternatívák felkutatására, amelyek hatékony megoldást kínálhatnak a légúti kórképek kezelésében. Az elmúlt évtizedben számos *in vitro* tanulmány igazolta a növényi illóolajok antibiotikum-rezisztens Gram-pozitív és Gram-negatív kórokozóval szembeni hatékonyságát különböző tesztrendszerekben (Pauli és Schilcher 2016), azonban kevés *in vivo* körülmények között végzett vizsgálat áll rendelkezésünkre velük kapcsolatban. Terápiás felhasználásuk ezért néhány kivételtől eltekintve főként a tradícionális alkalmazáson alapul. Komplex összetételüknek, valamint vélhetően több támadásponton kifejtett hatásmechanizmusuknak köszönhetően képesek hatékonyan elpusztítani a rezisztens kórokozókat is (Tiwari et al. 2009). Ennek ismeretében az illékony természetű növényi olajok mindenképpen figyelmet érdemelnek, mint az antibakteriális terápia lehetséges kiegészítői. Az egyes baktériumok által kiváltott kórképek részletezése a „4. Vizsgálati anyagok és módszerek" fejezetben kerül bemutatásra az általunk vizsgált törzseknél.

3.2 Az illóolajok általános jellemzése

3.2.1 Az illóolajok fizikai-kémiai jellemzése

Az illóolajok komplex összetétellel rendelkező, esetenként akár 100 komponensből is álló jellegzetes illatú, hidrofób anyagcseretermékek, amelyek az illóolajos növények szinte minden részében (pl. kéreg, gyökér, szár, levél, virág, termés) megtalálhatóak (Kon és Rai 2013). Speciális szövetekben és sejttípusokban választódnak ki és tárolódnak, szobahőmérsékleten többségük folyékony halmazállapotú. Nevükből adódóan egy idő után maradék nélkül elpárolognak. Színüket tekintve általában átlátszó, színtelen anyagok, azonban főként az *Asteraceae* család képviselői között találunk kék és zöld színű olajokat (pl. kamilla és cickafarkfű olaj) is (Rácz 2012). Az illóolaj-komponensek lipofil sajátságuknak köszönhetően szerves oldószerekben oldódnak. Az adott növényi részből általában vízgőz-desztillációval, szuperkritikus extrakcióval (CO_2), valamint enfleurage módszerrel vonhatók ki. Hőérzékeny illóolajok esetén (pl. *Citrus* sp.) a sajtolás technikáját alkalmazzák. Manapság egyre népszerűbbek a nagyobb hatékonyságot biztosító, gazdaságosabb és energiatakarékosabb, mikrohullámmal, illetve ultrahanggal kombinált extrakciós technikák is (Ma et al. 2015, Li et al. 2016). Fény és levegő hatására könnyen

gyantásodnak, így jól záródó edényben, fénytől védve célszerű tárolni őket (Tisserand és Young 2014).

Összetételüket tekintve terpenoid vegyületekből (mono- és szeszkviterpén vegyületek, valamint ezek származékai), fenil-propán-származékokból, valamint alacsony molekula tömegű alifás és aromás vegyületekből (pl. szénhidrogének, alkoholok, aldehidek) állhatnak. A kivont illóolaj összetétele minden esetben az adott növényre jellemző, azonban komponenseit tekintve jelentős eltérést mutathat akár ugyanannak a növénynek más drogrésze (pl. *Cinnamomum zeylanicum* kéreg és levél) (Tisserand és Young 2014). A drog illóolaj összetételét az éghajlati tényezők, a talaj, a földrajzi elhelyezkedés, a begyűjtés módja és ideje, valamint a tárolási körülmények egyaránt befolyásolhatják (Wright 2002, Kon és Rai 2013). A komponensek azonosítására a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (2010) gázkromatográfiás vizsgálatot ír elő. Számos összetevő esetén előfordul, hogy csupán az egyik izomer található meg az adott illóolajban, amely azonosító jellegű az illóolaj eredetiségének megítélése, valamint az adott illóolaj növényi forrásának meghatározása céljából. A különböző izomerek kimutatására nagy hatékonysággal alkalmazható az enantioszelektív-gázkromatográfia módszere.

3.2.2 A vizsgálatok során alkalmazott illóolajok bemutatása

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos több mint 25 illóolaj közül a légúti megbetegedések kezelésére elsősorban az eukaliptusz, a kakukkfű, a borsmenta, az ánizs, a keserű édeskömény és az erdeifenyő illóolaját alkalmazzák. Az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency, EMA) gyógynövény-monográfiái az illóolajok gyógyászati alkalmazását elsősorban a tradicionális és a régóta fennálló használat alapján javasolják. Jelenleg kevés *in vivo* vizsgálat áll rendelkezésünkre biztonságos és hatékony alkalmazhatóságuk megerősítésére. Vizsgálataink során az eukaliptusz, kakukkfű, borsmenta és erdeifenyő olaja mellett a szegfűszeg, fahéjkéreg citronella és az *Artemisia adamsii* Besser illóolajával végeztünk kísérleteket, amelyeket az alábbiakban jellemzünk, kiemelve a légutak kezelése céljából lényeges tulajdonságaikat.

3.2.2.1 A fahéjkéregolaj

A ceyloni fahéjfa (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) kérgéből általában vízgőz-desztillációval előállított átlátszó, esetenként halványsárga, jellegzetesen fűszeres illatú, könnyen folyó olaj.

Az illóolajat szolgáltató drog a 6-7 éves anyanövény ágairól lefejtett és megtisztított kéreg, amelynek illóolaj-tartalma nem kevesebb, mint 12 ml/kg (ESCOP 2003, Csupor és Szendrei 2012). A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos drog (*Cinnamomi zeylanici corticis aetheroleum*). Az illóolaj fő komponense a 63,1-75,7%-ban jelen lévő fahéjaldehid, amely mellett nagyobb mennyiségben eugenol (2,0-13,3%), fahéj-acetát (0,3-10,6%) és linalool (0,2-7,0%) található meg. Minor komponensei között szerepel a *β*-kariofillén, *p*-cimol, 1,8-cineol és az *α*-terpineol (Tisserand és Young 2014).

Felhasználása: Erős antibakteriális hatású. Alkalmazása emésztési panaszok, görcsök és puffadás esetén ajánlott (ESCOP 2003).

Adagolás: Maximális dózisa 1,25 mg/ttkg fahéj-aldehid, amely 115 mg/ttkg fahéjolajnak felel meg. Külsőleges készítményekben 0,05%-ban alkalmazható.

Mellékhatás: Nagy dózisban nyálkahártya irritáló hatású lehet. Hígítatlanul alkalmazva a bőrfelületen égési sérüléseket, hólyagokat, allergiás kiütéseket okozhat. Azon betegek esetén, akik cukorbetegségben szenvednek, nemrégiben műtéten estek át, gyomorfekély vagy vérzési problémák kapcsán gyógyszeres kezelésben részesülnek, különös körültekintést igényel az illóolaj alkalmazása (Tisserand és Young 2014).

3.2.2.2 A szegfűszegolaj

Az örökzöld 12-15 m magas szegfűszegfa (*Syzygium aromaticum* (L.) Merill et Perry) virágbimbójából desztillált sárga színű, átlátszó kissé viszkózusabb, a levegőn megbarnuló olaj. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos drogként szerepel (*Caryophylli floris aetheroleum).* Összetételét tekintve főként az eugenol komponens a meghatározó (73,5-96,9%). Nagyobb mennyiségben *β*-kariofillén (0,6-12,4%) és eugenil-acetát (0,5-10,7%) is található benne (Csupor és Szendrei 2012, Tisserand és Young 2014).

Felhasználása: Tradícionálisan száj- és torokfertőzések kezelésére, valamint fogfájdalom enyhítésre javasolt (HMPC Monográfia 2011).

Adagolás: Maximum 0,5%-os eugenol-tartalomnak megfelelő mennyiségben. Szájvizekben 1-5%-ban (HMPC Monográfia 2011, Tisserand és Young 2014).

Mellékhatás: Vérzési zavarok, műtét, fekélyre való hajlam, antikoaguláns terápia esetén alkalmazása fokozott körültekintést igényel. 18 éves kor alatt nem javasolt. Hígítatlanul súlyosabb bőrirritációt válthat ki.

3.2.2.3 A kakukkfűolaj

Az illóolaj a *Lamiaceae* családba tartozó, hazánkban is termesztett, évelő növény a közönséges vagy orvosi kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.), valamint az elsősorban Spanyolországban és Portugáliában honos spanyol kakukkfű (*T. zygis* L.) földfeletti, virágzó hajtásainak keverékéből állítható elő desztilláció útján. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben *Thymi aetheroleum*-ként szerepel. Tiszta, átlátszó vagy halványsárga, könnyen mozgó folyadék, amelynek illata jellegzetesen aromás, timolra emlékeztető. A timolos kemotípusba tartozó *T. vulgaris*-ból kinyert illóolaj fő komponense a 48,3-62,5%-ban előforduló timol, valamint az 5,5-16,3%-ban megtalálható karvakrol. Kisebb mennyiségben *p*-cimol, *γ*-terpinén, *β*-kariofillén és limonén is előfordul benne. A *T. zygis* illóolajában a timol kisebb százalékban, míg a *p*-cimol nagyobb mennyiségben található meg. Ezenfelül különbség, hogy számos, kis százalékban (<2,5%) jelenlévő komponenst tartalmaz (pl. *α*-pinén, (+)-limonén, terpinén-4-ol, kamfén, kámfor, *β*-mircén), amelyek az előbb említett olajra kevésbé jellemzőek (Csupor és Szendrei 2012, Tisserand és Young 2014).

Felhasználása: Illóolaját inhalálva, a növényből készült forrázatot elfogyasztva megfázásban a köpet felszakadásának elősegítésére, felső légúti hurutos megbetegedésekben, bronchitis esetén alkalmazzák. Antibakteriális, antivirális és antifungális hatású.

Adagolás: 1%-os timoltartalomnak megfelelő mennyiségben.

Mellékhatás: Nyálkahártya, valamint bőrirritációt okozhat. A véralvadást befolyásolhatja, ezért antikoaguláns terápiában részesülők esetén fokozott körültekintést igényel használata (Tisserand és Young 2014).

3.2.2.4 Az eukaliptuszolaj

A színtelen vagy halványsárga VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben is hivatalos eukaliptusz illóolajat (*Eucalypti aetheroleum*) az Ausztráliában honos, *Myrtaceae* családba tartozó *Eucalyptus globulus* Labill., *E. polybractea* R.T. Baker és *E. smithii* R.T. Baker leveleinek vagy fiatal hajtásvégeinek desztillátuma adja. Az *E. globulus*-ból kivont illóolaj kámforra emlékeztető aromás szagú és égető ízű, fő komponense az 1,8-cineol (65,4-83,9%). Ezenfelül meghatározó alkotója az *α*- és *β*-pinén, (+)-limonén, globulol, *p*-cimol, valamint az aromadendrén is. Az 1,8-cineol komponensen felül az *E. smithii* illóolaja esetén a *β*-

eudezmol, míg az *E. polybractea* illóolaja esetén a limonén és *p*-cimol komponens dominál (Tisserand és Young 2014).

Felhasználása: Belsőleges felhasználását illetően elsősorban standardizált készítményekben találkozhatunk vele, így biztonságos a használata. Az illóolaj fertőtlenítő, hurutoldó, köptető hatású, főként légúti megbetegedések (bronchitis, megfázás) gyógyításánál használható az adjuváns terápia részeként (ESCOP 2003).

Adagolás: Maximum 600 mg, illetve 20%-ban külsőleges készítmények esetén.

Mellékhatás: Az 1,8-cineol központi idegrendszeri izgató hatású kisebb gyermekek esetén. 10 éves kor alatt alkalmazása arcon nem javasolt (Tisserand és Young 2014).

3.2.2.5 A citronellaolaj

A Sri Lanka típusú citronella (*Cymbopogon nardus* L.) friss vagy szárított föld feletti részéből vízgőzdesztillációval előállított színtelen, vagy átlátszó halványsárga olaj. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben nem hivatalos drog. Illóolaj összetételét tekintve nagyobb mennyiségben citronellált (5,2-46,8%), geraniolt (16,8-29,1%), (-)-citronellolt (3,0-21,8%) és (+)-limonént (2,6-11,3%) tartalmaz. Kisebb mennyiségű komponensei közül a kamfén, citronellil-acetát, borneol, elemol, *α*-pinén, geranil-acetát, *β*-kariofillén, metil-izoeugenol és metil-eugenol említhető meg (Tisserand és Young 2014).

Felhasználása: Repellens készítményekben. Népgyógyászatban antireumatikumként, lázcsillapítóként, emésztést elősegítő szerként ismert (Abena et al. 2007).

Adagolás: Maximum 0,0004%-os metil-eugenol tartalomnak megfelelve minden készítmény esetén.

Mellékhatás: Hígítatlanul alkalmazva bőrirritációt, allergiás reakciót, kontakt dermatitiszt válthat ki (Tisserand és Young 2014).

3.2.2.6 A borsmentaolaj

A *Lamiaceae* családba tartozó borsmenta (*Mentha* × *piperita* L.) napjainkban a legnagyobb mennyiségben felhasznált mentafaj. Az anyanövény levele 1-3%-ban tartalmazza a színtelen, halványsárga vagy halvány zöldessárga illóolajat, amely a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben *Menthae piperitae aetheroleum* néven hivatalos. Az olaj szaga és íze jellegzetes, amelyhez kellemes hűsítő utóérzet társul. Fő komponensei a (-)-mentol (19-

54,2%) valamint ezek származékai: menton (8-31,6%), (-)-mentil-acetát (2,1-10,6%), neomentol (2,6-10%). 2-10%-ban 1,8-cineolt is tartalmaz (Tisserand és Young 2014).

Felhasználása: A terápia során a lipofil komponensek felszívódva a bőrön, légutakon, illetve a gasztrointesztinális nyálkahártyákon keresztül, stimulálják a váladékot termelő mirigyek aktivitását, és csökkentik a viszkózus nyák képződését a hörgőkben, ezért köptetőként előnyösen alkalmazható. A mentoltartalmú orrcseppek, spray-k csökkentik a nyálkahártyagyulladás következtében fellépő fokozott váladéktermelést, ezért az olajos orrcseppeket náthában előszeretettel alkalmazzák, de garat, valamint gégegyulladás esetén is népszerűek. Emellett jótékony hatású emésztési panaszok, puffadás esetén is (ESCOP 2003, Csupor és Szendrei 2012).

Adagolás: 0,02-0,08 ml illóolajat belsőleg alkalmazva emésztési bántalmak esetén. Inhalációs terápiában 3-4 cseppet forró víz felszínére cseppentve (ESCOP 2003). Bedörzsölőkben és krémekben 0,1-1%-os koncentrációban.

Mellékhatás: Hörgők görcsének veszélye miatt kisgyermekek esetén, főként az arc, az orr és a mellkas területén, az alkalmazást kerülni kell. Epeúti bántalmak, kőképződés lehetőségének fennállásakor az illóolaj epehajtó hatásával mindenképpen számolni szükséges. Súlyos májkárosodás esetén sem ajánlott alkalmazása. Gyomorégést, gastrooesophagealis refluxot válthat ki (ESCOP 2003, Csupor és Szendrei 2012).

3.2.2.7 Az erdeifenyő olaj

A *Pinus sylvestris* L. tiszta, színtelen vagy halványsárga, jellegzetes szagú illóolaját (*Pini silvestris aetheroleum*) a növény friss tűleveleiből és ágvégeiből vízgőz-desztillálással állítják elő. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos drog. Az illóolaj fő komponense az α-, valamint β-pinén. Nagyobb százalékban ezenfelül δ-3-karén, β-fellandrén, (+)-limonén, β-kariofillén, β-mircén komponenseket tartalmaz.

Felhasználása: Elsősorban a tradícionális használaton alapulva légúti betegségek, pl. hörghurut, megfázás, arc- és homloküreg-gyulladás kezelésére alkalmazzák. Inhaláló oldatokban, légzést könnyítő mellkas bedörzsölőkben, valamint antireumatikus készítményekben is megtalálható. Könnyen gyantásodik.

Adagolás: Fürdő készítéséhez 0,025 g illóolaj használata, fájdalomcsillapításra alkalmazott kenőcsökben pár csepp illóolaj hozzáadása ajánlott.

Mellékhatás: Bőr- és nyálkahártya-irritációt okozhat (Csupor és Szendrei 2012).

3.2.2.8 Az *Artemisia adamsii* Besser illóolaja

A növény a sztyeppék jellegzetes képviselője, elsősorban Mongóliában és Kínában fordul elő, de Európában is termeszthető. Az *Artemisia* nemzettségre jellemző morfológiai jegyek ennél a növénynél is megtalálhatóak, levelei keskenyek, szórtan állnak. Aranysárga virágai jellegzetes fészekvirágzatot képeznek a hajtások csúcsán (Wright 2002). Tartalmi anyagairól kevés információval rendelkezünk. Az eddigi vizsgálatok szerint a növény illóolajában limonént azonosítottak nagyobb mennyiségben, ezenfelül néhány guajanolid-vázas szeszkviterpént is tartalmaz (Bohlmann et al. 1985, Satar 1986).

Felhasználása: A hagyományos kínai orvoslásban teljes herbáját már régóta alkalmazzák amarumként, emésztési panaszok kezelésére (Wright 2002). Az orvosi gyakorlatban való alkalmazhatóságát bizonyító, illetve mikrobiológiai aktivitására vonatkozó információk azonban még nem állnak rendelkezésünkre.

Mellékhatás: A nemzetség számos tagjának illóolajára jellemző a magas tujon-tartalom, amely gyógyászati felhasználásukat nagyban korlátozza. A szerkezetét tekintve ez a biciklikus monoterpén keton komponens kis mennyiségben is központi idegrendszeri tüneteket és görcsöket képes kiváltani (200-400 mg). Az α-tujon jóval toxikusabb (s.c. egér LD_{50}: 87 mg/kg) sajátságú a β-tujonhoz (s.c. egér LD_{50}: 440 mg/kg) képest (Tisserand és Young 2014).

3.2.3 Illóolajok antibakteriális hatása légúti kórokozók ellen

Az illóolajok erőteljes antibakteriális, fertőtlenítő hatása már régóta ismert, gyógyászati felhasználásuk elsősorban inhalációs készítmények útján valósul meg a légúti kórképek kezelésében (Burt 2004, Bakkali et al. 2008). Az általunk vizsgált illóolajok közül némelyik a légúti megbetegedések terápiájában gyakran alkalmazott szer. Az erdeifenyő, az eukaliptusz, a borsmenta, a kakukkfű és szegfűszeg illóolaja megfázás tüneteit enyhítő, köhögéscsillapító és köptető gyógyszerekben, illetve gyógyszernek nem minősülő gyógyhatású készítményekben gyakori alkotó. Ugyancsak hasonló indikációban (pl. Aetheroleum pro inhalatione, Oleum pro inhalatione) fordulnak elő a Szabványos Vényminták gyűjteményben is (FoNo VII. 2003).

Az elmúlt évtizedben a vizsgálatainkban használt borsmenta, kakukkfű, citronella, szegfűszeg, erdeifenyő, eukaliptusz és fahéj illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálata egyre több kutatás alapját képezte, főként a klasszikus mikrobiológiai módszerekkel

kivitelezve (Burt 2004). Az *A. adamsii* illóolajával - tudomásunk szerint - ez idáig nem végeztek mikrobiológiai értékelést. Az inhalációs körülményeket legjobban modellező gőzteres vizsgálatokban napjainkig az általunk vizsgált illóolajok ételromlásért felelős mikrobákkal szemben mutatott hatását vizsgálták (Inouye et al. 2003, Matan et al. 2006, Tullio et al. 2007, Vilela et al. 2009). Csupán néhány irodalom áll rendelkezésre, amelyben légúti baktériumokat használtak ebben a tesztrendszerben (Inouye 2001a, Goñi et al. 2009, Tyagi és Malik 2011a,b, Houdkova et al. 2017). Az 1,8-cineolban gazdag *Eucalyptus polybractea* olajának ígéretes influenzavírus ellenes alkalmazására is találhatunk publikációkat (Pyankov et al. 2012, Usachev et al. 2013). Klasszikus módszerekkel (csőhígítás, agar diffúzió, korong diffúzió) vizsgálva az említett illóolajokat és komponenseiket ígéretes antibakteriális hatást írtak le fahéj, borsmenta, kakukkfű, szegfűszeg, eukaliptusz esetén *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA, *H. influenzae*, *Streptococcus pyogenes, Moraxella* sp. ellen (Dorman és Deans 2000, Hendry et al. 2009, Mulyaningsih et al. 2010, 2011, Inouye et al. 2011b, Kon és Rai 2012, Pereira et al. 2014, Pauli és Schilcher 2016). *Streptococcus mutans*-szal szemben ez idáig elsősorban fahéj- és szegfűszegolaj esetén tapasztaltak erőteljes antibakteriális hatást folyékony közegben vizsgálva, míg a borsmenta és erdeifenyő olaját tekintve enyhe aktivitást észleltek korongdiffúziós módszert alkalmazva (Langeveld et al. 2014, Choi et al. 2016). Az *E. globulus* olaja esetén gátló hatást regisztráltak a baktérium biofilm képzésére, míg egy másik tanulmányban korongdiffúzióval vizsgálva kevésbé hatékonynak találták (Goldbeck et al. 2014, Choi et al. 2016). Bioautográfiás módszerrel főként növénypatogén törzsekkel és MRSA-val szemben írtak le gátló hatást a kakukkfű, szegfűszeg, borsmenta, fahéjkéreg, eukaliptusz olaja esetén (Horváth et al. 2010, 2011). A kakukkfű illóolaját BioAréna rendszerben vizsgálva a timol és a karvakrol komponensének antibakteriális hatásáról egyedül *Pseudomonas syringae* és *Bacillus subtilis* ellen rendelkezünk adatokkal (Móricz et al. 2010). Mindezek mellett meg kell említeni, hogy a klasszikus módszerek eredményei sokszor nehezen összevethetők, standardizált módszer hiányában az egyes kutatások körülményeinek eltérései az eredményekre is nagy hatást gyakorolhatnak. Probléma továbbá, hogy főként az agardiffúziós vizsgálatok alkalmazásánál az illóolaj nem megfelelően diffundál a táptalajba, amely nagyban megkérdőjelezi a módszer alkalmazhatóságát (Horváth et al. 2010). Számos tanulmány írta le, hogy gőztérben vizsgálva aktivitásukat, az illóolajok erősebb antimikrobás hatással rendelkeztek, mint folyékony halmazállapotban (Doran et al. 2009, Mondello et al. 2009, Inouye et al. 2011b).

Számos illóolaj esetén annak gyógyászati alkalmazása egyelőre a tradícionális használaton alapul, ezért mindenképpen szükség van pontos hatásuk felderítésére, valamint illékony komponenseik hatásmechanizmusának vizsgálatára. Bár az illóolaj-összetevők baktériumokra kifejtett hatása még nem teljesen tisztázott, számos hatásmechanizmus már felderítésre került (Faleiro 2011, Hyldgaard et al. 2012). Megemlítendő azonban, hogy a kutatások során általában referencia törzseket alkalmaztak, így rezisztens baktériumok és klinikai betegekből izolált törzsek esetén továbbra is szükség van a lehetséges támadáspontok meghatározására. Az illóolajok nagy előnye, hogy komplex összetételüknek köszönhetően több módon fejtik ki hatásukat (Faleiro és Miguel 2012). A bakteriális sejtfal és külső membrán fehérjéinek szerkezetén túl (Helander et al. 1998, Karatzas et al. 2001, Derakhshan et al. 2008, Tiwari et al. 2009, Bouhdid et al. 2010, Nazzaro et al. 2013, Felső et al. 2013) befolyásolhatják az ATP termelést, quorum-sensing rendszert (Faleiro 2011), illetve gátolhatják a fehérjeszintézist (Burt et al. 2007). Bár az antibakteriális hatás kiváltása az esetek döntő többségében az illóolaj fő komponenséhez köthető (Burt 2004, Horváth et al. 2010), számos esetben írták le minor komponensek hatékonyabb szerepét a nagyobb mennyiségben jelenlévő összetevőkhöz képest (Marino et al. 2001, Viljoen et al. 2006). Feltételezik, hogy az illóolajban bekövetkező oxidációs folyamatok során képződő termékek hozzájárulnak a hatékonyabb antibakteriális aktivitáshoz; citrál, limonén és α-pinén komponensek esetén az oxidált-származékok potensebb hatása volt megfigyelhető (Grosjean et al. 1992, Orafidiya et al. 1993). Ezzel ellentétben főként ételpatogén törzseken végezve vizsgálatokat, az oxigénszegény környezet biztosítása kakukkfű, oregano, koriander illóolaj esetén eredményesebb antimikrobás hatást eredményezett, vélhetően az illóolaj komponenseinek kisebb mértékű átalakulása, valamint az adott baktériumok illóolajokra való nagyobb érzékenysége miatt (Paster et al. 1990, Stecchini et al. 1993, Tsigarida et al. 2000, Skandamis és Nychas 2001).

Inhalációs terápia alkalmazásánál fontos feladat, hogy az illékony anyagok minél kevesebb veszteséggel magas koncentrációban jussanak el a kezelendő területekre, illetve könnyen alkalmazhatók legyenek a betegek számára. Ennek megoldására számos szabadalommal védett eszköz került kifejlesztésre az utóbbi években (Hymes et al. 1987, Block et al. 2000, Vail és Vail 2006, Evani 2007, Kolins 2010, Sienkiewicz et al. 2012).

3.3 Az antimikrobás hatás *in vitro* vizsgálómódszerei

Egy adott készítmény vagy anyag antibakteriális hatásának *in vitro* vizsgálatára számos klasszikus módszer áll rendelkezésünkre. Fontos megemlíteni azonban, hogy ezek a technikák elsősorban hidrofil természetű anyagok esetén alkalmazhatók nagy hatékonysággal, ennélfogva az illóolajok estén az adott tesztrendszerben történő vizsgálat sokszor problémákba ütközik. Tekintettel arra, hogy az illóolajok nagy viszkozitású, illékony, több komponensű hidrofób anyagok, az eredetileg kidolgozott módszerek önmagukban nem megfelelőek hatásuk értékeléséhez, így mindenképpen optimalizálni szükséges az adott tesztrendszert. A felmerülő nehézségek közül az egyik legfontosabb tényező, hogy biztosítanunk kell az illóolaj komponenseinek stabil diszperzióját a vizes közegben, valamint a lipofil komponensek agar-lemezbe való diffúzióját. Hasonlóan fontos szempont, hogy megfelelő eljárást találjunk az életben maradt mikroorganizmusok detektálására, a vizsgált anyaggal való kezelést követően. Ezek alapján megkülönböztetünk dilúciós, diffúziós, bioautográfiás és gőzteres módszereket, amelyek közül a továbbiakban az illóolajok esetén leggyakrabban alkalmazott technikákat ismertetem.

3.3.1 Korongdiffúziós módszer

A módszer több változata közül napjainkban az illóolajok vizsgálatára a korongdiffúziós modell a legelterjedtebb. A vizsgálatok esetén a megfelelő csíraszámra beállított baktérium-szuszpenzió adott mennyiségét a megszilárdult agar felületén egyenletesen elszélesztik, majd ezután a vizsgálni kívánt illóolajjal átitatott papírkorongokat a beoltott táptalaj felszínére helyezik. A tenyészeteket egy napon át a megfelelő hőmérsékleten inkubálják, majd másnap meghatározzák a korongok körül kialakult gátlási zónák méretét, amelyből a mikroorganizmus adott szerre való érzékenységére lehet következtetni. A megolvasztott agarhoz, illetve az illóolajhoz a korongra való felvitel előtt felületaktív anyag adható, elősegítve ezzel az olaj egyenletesebb eloszlását. A módszer hátránya, hogy az illóolaj-komponensek táptalajba való diffúziója sokszor nem biztosítható megfelően, így a vizsgálat sem tud számunkra megbízható eredményt nyújtani. (Dorman és Deans 2000, Hood et al. 2003, Choma és Grzelak 2011, Tyagi és Malik 2011b, Choi et al. 2016, Pauli és Schilcher 2016).

3.3.2 Dilúciós módszerek

Az egyik legnépszerűbb antimikrobás vizsgálómódszerek közé tartozik. A minta mennyiségétől függően megkülönböztetünk makro- és mikrodilúciós technikákat. A kísérlet során a vizsgálandó illóolajat folyékony táptalajban diszpergálják, majd az alapoldatból általában hígítási sorozatot hoznak létre. Az illóolaj vizes közeggel való megfelelő elegyedéséhez különböző segédanyagokat (pl. Tween 80, dimetil-szulfoxid: DMSO) alkalmaznak. A hígítást addig folytatják, amíg az olaj megfelelő koncentrációjú lesz az adott térfogatban. Minden csőhöz a megfelelő csíraszámra beállított baktériumtenyészet azonos mennyiségét adják, majd homogenizálják és inkubálják a csövek tartalmát. A mikrobiológiai aktivitást vizuális úton, illetve agar táptalajra való kioltással határozzák meg a kontrollhoz viszonyítva.

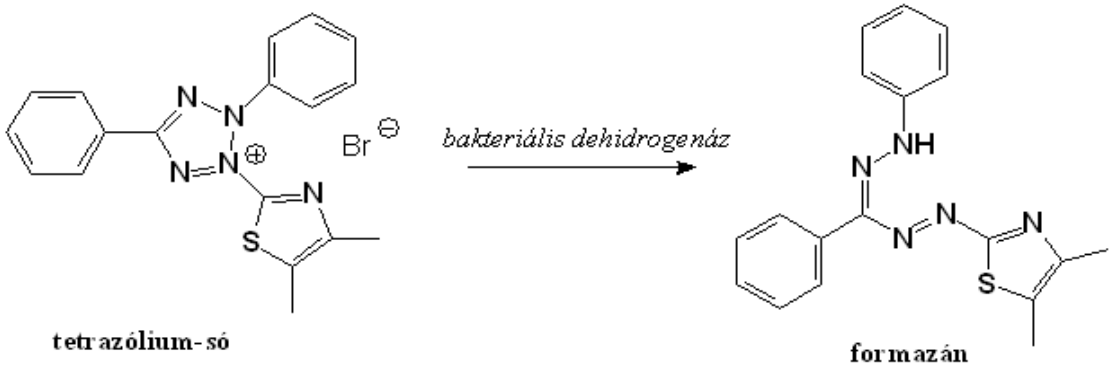
A módszer lehetőséget nyújt az antimikrobás hatás jellemzésére szolgáló MIC (minimum inhibitory concentration), valamint MBC (minimum bactericidal concentration) meghatározására. MIC értéken azt a minimális koncentrációját értjük egy anyagnak, amely a baktérium szaporodását a kontroll tenyészethez viszonyítva gátolja. Az MBC megmutatja, hogy melyik az alkalmazott szer legkisebb koncentrációja, amely már teljes mértékben csökkentette a csíraszámot. A módszer mikrodilúciós változatánál kisebb mennyiségű mintára van szükség, maga a hígítás is kisebb térfogatban (<200 µl) mikrobiológiai plate-n történik (Hood et al. 2003, Tyagi és Malik 2011a,b, Pauli és Schilcher 2016).

3.3.3 Bioautográfiás vizsgálatok

Napjaink egyik legkorszerűbb és legspecifikusabb módszere, amely segítségével több komponenst tartalmazó kivonatok antimikrobás hatása vizsgálható. Az eljárás nagy előnye, hogy ötvözi a vékonyréteg-kromatográfiás és mikrobiológiai vizsgálatokat, valamint kiküszöböli a dilúciós, illetve diffúziós technikák során fellépő anyagveszteségeket. A módszer eredményességét több tényező befolyásolhatja: a minta előállításának módja, pH-viszonyok, a minta oldhatósága, a mikroorganizmusok típusa, adalékanyagok, oldószerek, az adszorbens fajtája, az inkubálási hőmérséklet, valamint a detektáláshoz használt reagensek (Rios et al. 1988, Botz et al. 2001). Alkalmazása igen széleskörű, antibakteriális, antifungális, protozoon-ellenes, illetve citotoxikus szerek analízisére egyaránt használható. A bioautográfiás eljárások közül a direkt típust alkalmazzák a leggyakrabban.

A direkt bioautográfiás vizsgálat során a mikroorganizmusok növekedése a vékonyrétegen történik. A módszer első lépéseként a minta komponenseit választjuk el általában szilikagél állófázison. Az eluens elpárologtatása után a baktériumtenyészet optikai

denzitását (OD) 600 nm-en, 1 cm-es küvettát alkalmazva megmérjük. Az OD értéket 0,2-0,5 közé beállítva tudjuk elérni a sikeres vizsgálathoz szükséges 4 x 10^7 CFU/ml csíraszámot. Következő lépésként a rétegeket a baktérium-szuszpenzióba merítjük 10 másodpercig, szobahőmérsékleten megszárítjuk, és párakamrába helyezzük, majd megfelelő hőmérsékleten inkubáljuk 17 órán át. Ez az időtartam mikroorganizmusonként eltérhet, ahogy a vizsgálat többi paramétere is mindig a választott mikrobához igazodik. Az antimikrobás hatás detektálása egy tetrazóliumsó (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólium-bromid: MTT) 0,8 g/L koncentrációjú vizes oldatának segítségével történik. Az inkubált rétegeket az MTT festék vizes oldatába merítjük, majd újabb 2 órás inkubálás következik. A detektálás alapja, hogy a sárga színű tetrazóliumsó oldatából a rétegen található élő baktériumok NAD^+-függő laktát-dehidrogenáz enzime színes, kékes-lila színű formazán-származékot képez (2. ábra).



2. ábra az MTT festék redukciója

Ennek eredményeként a mikrobiológiailag aktív komponensek a kékes-lila hátterű rétegen fehér foltokként jelennek meg gátlási zónát reprezentálva (Botz et al. 2001). Túlnyomásos rétegkromatográfia alkalmazása (OPLC) a szabályozott áramlás, a standardizált elválasztási körülmények, a rövid szeparációs idő, a nagy felbontás és a megismételhetőség, valamint magas minta analizálási teljesítmény biztosítása optimálisabb mikrobiológiai detektálást tesz lehetővé (Tyihák et al. 1979, Choma és Grzelak 2011). Anaerob baktériumok vizsgálta a módszer körülményeinek módosításával szintén kivitelezhető (Kovács et al. 2016).

3.3.4 Gőzteres vizsgálómódszerek (vapor phase techniques)

A gőzteres vizsgálatok során az előző módszerekkel ellentétben az illóolaj nincs direkt kontaktusban a tesztmikroorganizmussal, csupán az illékony komponensek által kialakított gőztér érintkezik az adott törzzsel. A módszer többféle tesztrendszerben valósítható meg. Az egyik esetben a módszer alapja a korongdiffúziós módszer módosítása, amelynek során a Petri-csésze tetejébe helyezik az illóolajjal impregnált korongokat, az alsó részbe pedig a megfelelő táptalajon elszélesztett mikroba kerül. Inkubálás után a kialakult gátlási zónák átmérőit határozzák meg (Lopez et al. 2005, Mondello et al. 2009, Goni et al. 2009, Nedorostova et al. 2009). Egy másik elrendezés szerint a szilárd táptalaj felszínén elszélesztett mikroorganizmust és a párolgó illóolajat meghatározott térfogatú kamrába teszik, majd meghatározzák a kialakult gátlási zónák átmérőit, a látható baktériumtelepek számát, vagy az adott anyag legkisebb hatásos dózisát (Doran et al. 2009, Inouye et al. 2011a,b). A módszer előnye, hogy az alkalmazott kamrák viszonylag nagyobb térfogattal rendelkeznek egy Petri-csészéhez viszonyítva, így könnyebben kapcsolhatók össze más tesztrendszerekkel. Ennélfogva meghatározható a baktériumok jelenlétének változása az idő függvényében, illetve a légtérbe került illékony komponensek százalékos mennyisége is (Al Yousef 2014).

A gőzteres vizsgálatok gazdaságosabb kivitelezési módja az osztott Petri-csésze alkalmazása. A csészék osztataiba azonos szaporodási körülményeket igénylő baktériumok szuszpenziói kerülnek elszélesztésre. A vizsgálati mintákat ezután steril, a csésze átmérőjéhez igazodó szűrőpapíron szélesztik szét, majd a Petri-csésze osztatára helyezik, így az illóolaj nem érintkezik az agar felszínével. A Petri-csésze lezárása és inkubációja után határozzák meg a MIC értéket. A módszer előnye, hogy több mikroorganizmust tudunk egyszerre azonos körülmények között vizsgálni, valamint a Petri-csésze egy osztatát szabadon hagyva a vizsgált anyagok és a táptalaj kontaminációját szintén lehetőségünk van ellenőrizni (Laird és Phillips 2011, Kloucek et al. 2012a,b).

3.4. Illóolajok és illóolaj-komponensek kölcsönhatása

Az elmúlt évtizedek folyamán az illóolajok és illó komponensek kölcsönhatását vizsgáló publikációk száma közel duplájára emelkedett. A kombinációik ígéretes terápiás megoldást jelenthetnek az egyre nagyobb számban megjelenő rezisztes fertőzésekkel szemben, az általános rezisztencia mechanizmusokkal szembeni ellenállásuknak, valamint alkotóik különböző hatásmódjának köszönhetően (Burt 2004, Bassolé és Juliani 2012, Langeveld et al. 2014).

3.4.1 A kölcsönhatások *in vitro* vizsgáló módszerei

Az illó komponensek egymással és egyéb anyagokkal (pl. antibiotikumok, méz, ezüst ionok, nanorészecskék) való kombinációinak antibakteriális hatását leggyorsabban és leghatékonyabban *in vitro* módszerekkel tudjuk kimutatni. A diffúzión és dilúción alapuló vizsgálatok elsődleges célja, hogy felderítse az adott kombináció esetén szinergista, additív vagy antagonista hatás áll fenn a komponensek között. A diffúziós próbák alapja megegyezik a 3.3.1. fejezetben ismertetettekkel, a vizsgálatok során az önállóan felvitt komponensek és a kombinált minta gátlási zónái kerülnek összehasonlításra. Szinergista hatásúnak tekinthető egy kombináció, amennyiben annak gátlási zónája meghaladja az önállóan alkalmazott komponensek gátlási zónáinak összegét, additív hatású amennyiben nem különbözik attól. Antagonista a kombináció, ha a gátlási zóna mérete kisebb, mint az önálló koponensek által kiváltott hatás, vagy azok összege (Langeveld et al. 2014, Semeniuc et al. 2017, Boonyanugomola et al. 2017). A korongdiffúziós módszer eredményesen kombinálható gőzteres vizsgálatokkal (Gońi et al. 2009) is, amelyek során a korongra felvitt minta gátlási zónájának változását figyelik meg egy illó komponens által kialakított gőztérben, illetve a korongra felvitt kombináció együttes hatását viszonyítják a komponensek által önállóan kiváltott gátláshoz (Veras et al. 2012, Pereira et al. 2017).

Mikrodilúciós módszerek alkalmazása során az egyes kombinációk MIC értékei kerülnek összehasonlításra. A módszerek közül az egyik leghatékonyabb a checkerboard-titrálás, amelynek lényege, hogy a komponensek ellentétes irányban növekvő koncentrációit kombinálva értékeljük a baktériumok szaporodására kifejtett gátlást a kezeletlen kontrollhoz képest. A vizsgálatok eredményeként az egyes komponesek frakcionális gátló koncentrációinak (FIC_A, FIC_B), valamint ezek összegének (frakcionális gátló koncentrációs index, FICI) kiszámításával megállapítható a vizsgált anyagok közti kölcsönhatás.

A FIC index számítási módja:

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_{A\ kombináció}}{MIC_{A\ önálló}} + \frac{MIC_{B\ kombináció}}{MIC_{B\ önálló}}$$

A $MIC_{A,B\ önálló}$ az egyedül alkalmazott hatóanyag MIC értékét jelöli önálló alkalmazás esetén, amíg a $MIC_{A,B\ kombináció}$ az adott anyagokat együtt alkalmazva megállapított MIC értékeket fejezik ki. Amennyiben a FICI érték kisebb vagy egyenlő, mint 0,5 a kombinációt szinergistának, 0,5-1 között érték esetén additívnak, 4 és annál nagyobb értéknél antagonistának tekinthetjük (Langeveld et al. 2014, Clemente et al. 2016). Megemlítendő

azonban, hogy a tartományok nem tekinthetők egységesnek, egyes publikációk nem különítenek el additív kölcsönhatást, valamint alacsonyabb, illetve magasabb FICI értékhez rendelik a szinergista és antagonista kölcsönhatás megállípítását (Bassolé és Juliani 2012, Galluci et al. 2009, Adrar et al. 2016, Ghabraie et al. 2016).

A dilúciós módszerek másik lehetséges fajtája, hogy adott hatóanyag előzetesen meghatározott MIC értékének változását értékeljük egy hozzáadott másik komponens hatására (Miladi et al. 2017). A time-kill vizsgálatok segítségével az adott kombináció csíraszám-csökkentő hatásáról nyerhetünk információt a kezelés óta eltelt idő függvényében. A módszer hátránya, hogy egyszerre csak meghatározott számú kombinációról ad információt, nem detektálhatók vele az additív hatások, valamint a kölcsönhatás meghatározásához a csíraszám folyamatos monitorozása szükséges (Ye et al. 2013).
A kombinációs kezelések antibakteriális hatását elektronmikroszkópos megfigyelésekkel kiegészítve a bakteriális biofilm képződésre gyakorolt hatásról, illetve a keverékek hatásmechanizmusáról nyerhetünk bővebb információt (Gupta et al. 2017, Miladi et al. 2017).

A fentiek tekintetében jól látható, hogy standard módszer sajnos nem áll rendelkezésünkre a kölcsönhatások vizsglatára. A módszerek eltérő paramétereknek köszönhetően az egyes kutatócsoportok eredményeinek összevetése gyakran ütközik nehézségekbe, sokszor jelent akadályt az illóolaj forrásának és anyanövénye megnevezésének hiánya, valamint a kölcsönhatást értékelő eltérő tartományok alkalmazása is.

3.4.2 Illóolajok és illóolaj-komponensek kombinációja az iparban

Az elmúlt évek során a legtöbb kölcsönhatást vizsgáló közlemény élelmiszerpatogén baktériumok és gombák vizsgálatára irányult, az *in vitro* vizsgálatok során megfigyelték, hogy legerősebb antibakteriális hatással az aldehid és fenolos komponenseket (pl. fahéjaldehid, citrál, eugenol, karvakrol, timol) tartalmazó illóolajok rendelkeztek. Ezzel szemben a ketonokat és észterszármazékokat (α-tujon, β-mircén) nagyobb mennyiségben tartalmazó olajok általában inaktívnak bizonyultak (Bassolé és Juliani 2012, Hossain et al. 2016, Rai et al. 2017). A kezelt élelmiszer pH értékét, az alacsony tárolási hőmérsékletet, zsírtartalmat, fehérjetartalmat illetve a magas sótartalmat egyaránt az illóolajok antibakteriális hatását befolyásoló tényezőként tartják számon (Valero és Francés 2006, Tserennadmid et al. 2011, Calo et al. 2015). Matan és munkacsoportja (2006) az

élelmiszerek csomagolása során a fahéj- és szegfűszegolaj kombinációja által képzett gőzteret alkalmazva módosított légköri paraméterek mellett (CO_2 40%, O_2 <0.05%) annak preventív hatását figyelte meg több penész- (*Penicillium roqueforti, Aspergillus flavus, Eurotium* sp.), és élesztőgomba (*Candida lipolyticus, Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*) valamint ételpatogén baktérium esetén. Kimutatták, hogy az illóolajok gőztér formában eredményesebb gátló hatást biztosítottak, ezenfelül kevésbé befolyásolták a termékek ízét és aromáját. *Aspergillus* törzseket vizsgálva Hossain és munkatársai (2016) 28 illóolaj kombináció közül a fahéj-kakukkfű, oregánó-kakukkfű, borsmenta-teafa kombinációját több *Aspergillus* fajjal szemben szinergistának értékelték, ezzel szemben a fahéj-eukaliptusz, fahéj-teafa, eukaliptusz-teafa elegyét additív, a fahéj-oregánó, fahéj-borsmenta keverékét antagonista hatásúként írták le.

Az utóbbi években a nanotechnológiával kombinált fejlesztések az antibakteriális hatás potencírozását célozták meg a hatóanyagok felszabadulásának szabályozásával, farmakokinetikai paramétereik módosításával, illetve biohasznosulásuk növelésével. A nanorészecskék illóolajokkal való kombinációja során kedvező eredményt értek el az élelmiszerek csomagolása, élettartamuk meghosszabbítása kapcsán, ezen felül kiküszöbölték az olajok vizes közegben való oldhatatlanságát is (Hill et al. 2013, Campos-Requena et al. 2017, Rai et al. 2017). Timol zein nanorészecskékkel kombinálva hosszabb ideg volt képes megakadályozni a Gram-pozitív baktériumok elszaporodását a kontoroll csoporthoz képes, míg a poli-laktát-ko-glikolsav nanokapszulába csomagolt karvakrol a biofilmképzésre gyakololt hatékonyabb gátlást (Iannitelli et al. 2011, Zhang et al. 2014)
Nanorészecskék alkalmazásával az illó komponensek felesleges párolgása is szabályozhatóvá vált. Így csökkent a szükséges hatóanyagok koncentrációja, ezáltal toxicitásuk az élő szervezetekre, valamint kevésbé érzékelhetővé vált aromájuk a kezelt terméken (Rai et al. 2017).

A komponensek közötti kölcsönhatásokért felelős hatásmechanizmusok egyelőre még nem teljesen tisztázottak, az eddig elvégzett vizsgálatok alapján több lehetséges módot is valószínűnek tartanak a szinergista hatások kifejtésére. Általánosan elfogadott, hogy a Gram-pozitív baktériumok az esetek többségében a külső membrán hiánya, így az illóolajokkal való direkt kontaktus következtében érzékenyebben reagálnak a sejtet károsító hatásokra (Rai et al. 2017). A minta komplex összetételének köszönhetően az adott keverék több támadásponton is ki tudja fejteni hatását, ennek köszönetően a rezisztencia mechanizmusokkal szemben is sokkal ellenállóbb (Kon és Rai 2013). A mintában lévő

komponensek ezen felül egymás kedvezőtlen hatásait is gátolhatják így elősegítve a kedvező hatások érvényesülését (Wagner és Ulrich-Merzenich 2009).

A fenolos illóolaj-komponensek esetén elsősorban a külső sejtfalra és sejtmemránra gyakorolt károsító hatásokat tartják legjelentősebbnek, míg bizonyos komponensek a sejten belül enzimatikus és energiatermelésért felelős folyamatok gátlásával idézik elő a sejtek mielőbbi halálát. Timol és karvakrol kombináció eredményesen növelte a sejtmembrán átjárhatóságát *S. typhimurium* esetén, illetve elősegítette a fahéjaldehid hozzákötődését a sejtmembrán fehérjéihez, amely közvetlen károsodásokat eredményezett. Eugenol-timol kombinációja esetén hasonló hatást figyeltek meg *E. coli*-val szemben, az eugenol fahéjaldehiddel való kombinációjának gátló hatása ezzel szemben vélhetően enzimatikus folymatok befolyásolásához volt köthető (Hemaiswarya és Doble 2009, Pei et al. 2009, Rogiers et al. 2017). A fahéjolajjal való kezelés esetén az előbb említett hatások mellett a membrán permeabilitásának változását figyelték meg, amely hozzájárult a sejt elektrolit és energiaveszteségéhez, valamint a fehérjék és nukleinsavak sejten belüli koncentrációjának emelkedéséhez (Rai et al. 2017). Teafaolaj, fahéjsav, *p*-cimén és *γ*-terpinén esetén az antibakteriális hatás szintén a membránkárosító hatáshoz volt köthető (Langeveld et al. 2014). Geraniol esetén ezenfelül az efflux mechanizmus gátlása is szerepet játszhat a rezisztens baktériumokkal való küzdelemben (Lorenzi et al. 2009). Kémiai szerkezethez köthető, hogy több komponens acetát formája (linalil-acetát, geranil-acetát, bornil-acetát) jelentősebb antibakteriális hatást ért el az alapmolekulához képest (Pasdaran és Sheikhi 2016). Ezen felül a citrál, karvon és *α*-pinén anti-quorum sensing aktivitását is publikálták már (Kon és Rai 2013). Köszönhetően a komponensek eltérő hatásmechanizmusának az illóolajokat a legtöbb esetben hatékonyabbnak találták, mint magukat az izolált komponenseket (Burt et al. 2004, Bassolé és Juliani 2012, Calo et al. 2015). Így mint utaltunk is rá az előző fejezetekben, a kis mennyiségben jelen lévő komponenseket sem szabad figyelmen kívül hagyni az antibakteriális hatás értékelésénél.

3.4.3 Illóolajok és illóolaj-komponensek kombinációja a gyógyászatban

Az élelmiszeriparban jelentős törzsek vizsgálata mellett egyre több *in vitro* vizsgálat szentel figyelmet az illóolajok és komponenseik humán patogénekkel szembeni aktivitásának.

A vizsgálatok elsősorban a keverékek antibakteriális és antimikotikus hatásával foglalkoznak, emellett azonban parazitaellenes, repellens és féregűző tulajdonágot is kimutattak (Braga et al. 2007, Reegan et al. 2014, Horváth et al. 2016, Sharma et al. 2017).

A citrál, eugenol és timol hármas kombinációja ugyancsak hatékony *Crithidia fasciculata* és *Trypanosoma cruzi* fertőzések esetén (Azeredo és Soares 2013). A *Haemonchus contortus* ellen folytatott vizsgálatokban a fahéjaldehid karvakrollal, valamint timollal készített kombinációját anthelmintikumként említik (Katikia et al. 2017). Humán sejtvonalakon elvégzett tesztek során az 1,8-cineol, linalool és szimvasztatin egymással való kombinációi eredményes koleszterinszint-csökkentőnek bizonyultak (Rodenak Kladniew et al. 2014). Kevés számú *in vivo* vizsgálat áll rendelkezésünkre a keverékek vizsgálatáról, néhány esetben azonban az illó komponensek egymással és egyéb anyagokkal való kombinációinak gyulladás és fájadalomcsillapító hatását igazoltnak találták. Redasani és munkatársai (2012) eredményesen kombinálták az ibuprofen prodrug-ját, mentollal, timollal és eugenollal. A gyulladáscsökkentő hatás fokozása mellett a gasztrointesztinális toxicitás csökkenéséről is beszámoltak patkányokon végzett tesztjeikben. Beltrán-Villalobos és kutatócsoportja (2017) szintén patkányokon kiváltott fájdalommodellben a szegfűszeg- és rozmaringolaj szinergista hatását figyelte meg ketorolakkal kombinációban.

Sajnos a léguti fertőzések esetében leggyakoribb kórokozók többsége esetén még nem végeztek az illó komponensek kölcsönhatására irányuló *in vitro* vizsgálatokat. *In vivo* vizsgálatok pedig csupán korlátozott számban állanak rendelkezésünkre. A légutakban is előforduló patogénekre fókuszálva az eddig tesztelt kombinációk eredményeit a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: Illóolajok és komponenseik kölcsönhatásának eredményei légúti patogének esetén

Kombináció		Légúti patogén	Kölcsönhatás	Referencia
1,8-cineol	Aromadendrén	MRSA, *S. pyogenes*	Szinergista	Mulyaningsih et al. 2010
Eugenol	Mentol	*P. aeruginosa*	Szinergista	Bassolé et al. 2010
		S. aureus	Nincs kölcsönhatás	Gallucci et al. 2009
	Timol	*S. mutans*	Additív	Didry et al. 1994
		S. aureus	Nincs kölcsönhatás	Gallucci et al. 2009
		P. aeruginosa	Szinergista	Bassolé et al. 2010
Fahéjaldehid	Eugenol	*Staphylococcus sp.*	Additív	Moleyar et al. 1992
	Timol	*S. mutans*	Additív	Didry et al. 1994
	Eugenol			
	Karvakrol	*S. aureus*	Szinergista	Ye et al. 2013
Geraniol	Mentol	*S. aureus*	Szinergista	Gallucci et al. 2009
	Timol, eugenol		Nincs kölcsönhatás	

2. táblázat (folytatás)

Karvakrol	Mircén	*S. aureus*	Antagonista	Gallucci et al. 2009
	Eugenol	*P. aeruginosa*	Additive	Bassolé et al. 2010
	Linalool, mentol		Nincs kölcsönhatás	
Limonén	1,8-cineol	*S. aureus*, *P. aeruginosa*	Szinergista	Van Vuuren és Viljoen 2007
Linalool	Mentol	*P. aeruginosa*	Additív	Bassolé et al. 2010
	Eugenol, timol		Szinergista	
Timol	Mentol	*S. aureus*	Antagonista	Gallucci et al. 2009, Bassolé et al. 2010
		P. aeruginosa	Szinergista	
	Karvakrol	*S. aureus*	Additív/ Antagonista	Lambert et al. 2001, Gallucci et al. 2009 Bassolé et al. 2010
		P. aeruginosa	Szinergista/ Additív	
Cinnamomum verum J.S. Presl.	Allil-izotiocianát	*S. aureus*	Nincs kölcsönhatás	Clemente et al. 2016
		P. aeruginosa	Additív	
	Thymus vulgaris L.	*S. aureus*	Additív	Fei et al. 2011, Goni et al. 2009 Horváth et al. 2016
		Aspergillus fumigatus	Nincs kölcsönhatás	
	Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry	*S. aureus*, *A. terreus*	Additív	
	Cymbopogon nardus (L.) Rendle	*A. fumigatus*	Nincs kölcsönhatás	
		A. niger	Antagonista	
Cymbopogon citratus (DC)	*Cymbopogon giganteus* Chiov.	*S. aureus*	Szinergista	Bassolé et al. 2011
Levisticum officinale Koch.	*Ocimum basilicum* L.	*S. aureus*, *P. aeruginosa*	Antagonista	Semeniuc et al. 2017
	Thymus vulgaris L.			
Lippia multiflora Mold	*Mentha piperita* L.	*S. aureus*	Additív	Bassolé et al. 2010
Lippia multiflora Mold.	*Ocimum basilicum* L.		Nincs kölcsönhatás	
Mentha piperita L.			Szinergista	
Origanum vulgare L.	*Ocimum basilicum L.* *Thymus vulgaris* L.	*P. aeruginosa*	Additív	Gutierrez et al. 2008
	Melissa officinalis L. *Origanum majorana* L. *Salvia triloba* L. *Rosmarinus officinalis* L		Nincs kölcsönhatás	
Ocimum basilicum L.	*Thymus vulgaris* L.	*S. aureus*, *P. aeruginosa*	Antagonista	Semeniuc et al. 2017
Petroselinum crispum L.	*Levisticum officinale* Koch.			
	Ocimum basilicum L.			
	Thymus vulgaris L.			
Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry	*Rosmarinus officinalis* L.	*S. aureus*, *P. aeruginosa*	Additív	Fu et al. 2007

A vizsgálatok nagy része ez idáig *S. aureus* és *P. aeruginosa* ellen történt a hatásos kombinációk alkotói az élelmiszeriparban is jelentős potenciállal rendelkező citronellaolaj,

fahéjaldehid, timol, mentol és eugenol voltak. *M. catarrhalis* esetén a *Cymbopogon nardus* illóolajának ezüstionokkal való kombinációja esetén szintén szinergista hatást detektáltak (Ahmad és Viljoen 2015).

Köszönhetően az egyre nagyobb számban megjelenő rezisztens törzseknek, az elmúlt évek során egyre nagyobb hagsúlyt kapott a klasszikus antimikrobás szerek és természetes hatóanyagok kombinációjának lehetősége. Ennek köszönhetően az antibiotikumok, illóolaj-komponensek és illóolajok kölcsönhatását vizsgáló publikációk száma is rohamosan emelkedett. A légúti patogénekkel szemben eddig publikált eredmények összegzése tekintettel a táblázatok terjedelmére, a disszertáció 1. és 2. mellékleteként kerül ismertetésre. A vizsgálatok során számos antibiotikum-rezisztens Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium került bevonásra. A legtöbb vizsgálatot ez idáig a timol és kakukkfűolaj kapcsán végezték. Megemlítendő azonban, hogy különböző kakukkfű fajok illóolajának aktivitása jelentősen eltért egymástól.

Szinergista hatás elsősorban Gram-pozitív baktériumok (*Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.) ellen volt megfigyelhető. A szinergista hatást az antimikrobás szerek timollal, fahéjaldehiddel, karvakrollal és eugenollal való kombinációja eredményezte. Emellett az illóolajokkal való együttes alkalmazás a Gram-pozitív baktériumokkal szembeni aktivitás mellett számos Gram-negatív (pl. *K. pneumoniae, M. catarrhalis, A. baumannii, P. aeruginosa*) törzs esetén is hatékonynak bizonyult.

Az összegzett publikációk eredményeinek összevetése kapcsán is érvényesültek az élelmiszeripari vizsgálatoknál említett korlátozó tényezők, sok esetben nem került említésre az illóolajok összetétele, valamint konkrét eredete sem. A kölcsönhatások vizsgálatára a checkerboard módszer volt főként jellemző, de korongdiffúziós és vapor phase tesztek is előfordultak (Bassolé és Juliani 2012, Langeveld et al. 2014).

Megemlítendő, hogy ezen területen egyedül, a citrállal végeztek állatkísérletet, amelynek során az illó komponens önálló és norfloxacinnal kombinált adagolása esetén az MRSA-val fertőzött egerek szerveiben a kontrollcsoporthoz viszonyítva a csíraszámot szignifikánsan alacsonyabbnak találták. Az antibiotikummal kombinált kezelés hatékonyságát azonban az egyedül citrállal kezelt csoport nem tudta meghaladni (Gupta et al. 2017). Két esettanulmány szerint az ausztrál teafaolaj inhalációja *M. tuberculosis* fertőzés esetén enyhítette az irritáló köhögést, 4-5 napos inhaláció után a vett köpetminták negatív eredményéről számoltak be mindkét esetben. Ezután kezdték el a betegek tuberkulozis ellenes szerekkel való kezelését. Mivel az inhaláció időben elkülönült a klasszikus terápiától

nem beszélhetünk szinergista hatásról, az esetek megfigyelései azonban ígéretes további vizsgálatok alapjait képezik (Sherry et al. 2004).

A 2. táblázatban feltüntetett eredményeket figyelembe véve elmondható, hogy mindeképpen érdemes további vizsgálatokat folytatni más légúti fertőzéseket okozó mikroorganimusokkal is. Az egyre nagyobb számban előforduló rezisztens törzsek miatt elsősorban ezek kezelésére lenne célszerű fókuszálni. A vizsgálatok a későbbiekben megfelelő alapot szolgáltathatnak *in vivo* tesztek kivitelezéséhez is, amelyek a hatásos kombinációk gyógyászati felhasználásának előremozdítását segítenék elő a jövőben.

4. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A vizsgálatok során alkalmazott illóolajok

Vizsgálataink során olyan gyógyászatban is alkalmazott illóolajokat alkalmaztunk, amelyek baktériumok által okozott légúti megbetegedések esetén a gyógyszeres terápia eredményes kiegészítői lehetnek. Ennek megfelelően a fahéjkéreg (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.), szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* (L.) Merill & Perry), kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.), eukaliptusz (*Eucalyptus globulus* Labill.), erdeifenyő (*Pinus sylvestris* L.), borsmenta (*Mentha* x *piperita* L.) és citronella (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) illóolaját vontuk be a vizsgálatokba. A minták a budapesti Aromax Zrt.-től kerültek beszerezésre. Az illóolajokat a mikrobiológiai vizsgálatok megkezdését megelőzően minden esetben gázkromatográfiás analízisnek vetettük alá, minőségi, illetve mennyiségi összetételük meghatározása és ellenőrzése céljából. Az alkalmazott illóolajok gyártási számait a dolgozat 3. melléklete tartalmazza.

Kutatásunk bővítéseként lehetőségünk volt egy Mongóliában honos illóolaj-tartalmú gyógynövény, az *Artemisia adamsii* Besser illóolajának vizsgálatára is. A növényi anyag begyűjtését és azonosítását Dr. Tserennadmid Rentsenkhand biológus (National University of Mongolia, School of Biology) 2010 júliusában Ulánbátor közelében (47° 55' 16.4280" N, 106° 55' 6.8016" E 1304 m) végezte el számunkra. A drog illóolaj-tartalmának meghatározására vízgőz-desztillálációt végeztünk a VII. Magyar Gyógyszerkönyvnek megfelelő berendezéssel. A módszer során, közvetlenül a felhasználást megelőzően aprított 25,0 g tömegű, abszolut száraz droghoz 500 ml vizet adva, a forrástól számított 3 órán át végeztük a desztillálást.

4.2 Analitikai vizsgálatok

4.2.1 A gázkromatográfiás analízis paraméterei

A gázkromatográfia az illóolajok összetételének vizsgálatára különösen alkalmas módszer, mivel ennek során a minták elpárologtatása nagyobb veszteség nélkül történik, ugyanakkor az eljáráshoz kapcsolt technikák lehetőséget adnak a komplex összetétellel rendelkező minták átfogó elemzésére.

A vizsgált illóolajok gázkromatográfiás elemzését a budapesti Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetében Dr. Böszörményi Andrea végezte el számunkra. A mérések során lángionizációs (flame ionization detector – FID), valamint tömegspektrometriás (mass spectrometry – MS) detektálások történtek. Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) használatával értékeltük. A kvantitatív meghatározás során a komponensek retenciós idejét és tömegspektrumait standardok és a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést területnormalizációval végeztük el (Adams 2001).

Az Aromax Zrt-től beszerzett illóolajok, valamint az általunk desztillált *Artemisia* illóolaj GC-MS és GC-FID elemzésének mérési körülményeit a 3. táblázat foglalja össze. Az sHS-SPME, gőzteres és csőhígításos vizsgáltok során használt illóolajok analitikai eredményei a dolgozat 5.2 fejezetében és 4. mellékletében kerültek feltüntetésre. A kölcsönhatást vizsgáló tesztek során alkalmazott illóolajokra vonatkozó analitikai adatokat a dolgozat 5. mellékletében közöljük.

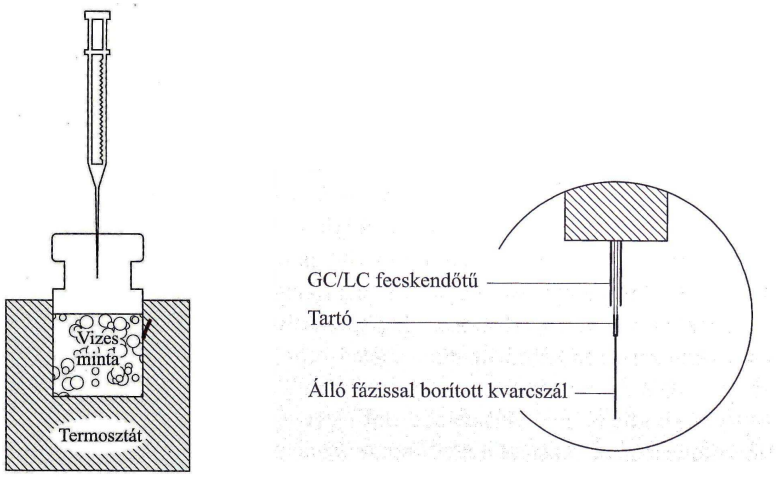
3. táblázat Illóolajok GC-MS és GC- FID vizsgálatának mérési körülményei

	GC-MS (1)	**GC-MS (2)**	**GC-FID (1,2)**
Készülék:	Agilent 6890N		Fisons 8000
Oszlop:	30 m x 0,25 mm i.d, Agilent HP-5MS (filmvastagság 0,25 µm)	30 m x 0,25 mm i.d, Agilent SLB-5MS (filmvastagság 0,25 µm)	30 m x 0,25 mm Rt-β-DEXm (filmvastagság 0,25µm)
Program:	60˚C 3 perc, 8˚C/perc 60-200˚C, 200˚C 2 perc, 10˚C/perc 200-250˚C, 250˚C 15 perc	60˚C 3 perc, 8˚C/perc 60-250˚C, 250˚C 1 perc	8˚C/perc 60-230˚C, 230˚C 5 perc
Vivőgáz:	nagy tisztaságú hélium 6.0, 1,0 ml/perc, (37 cm/s), constant flow mode		nitrogén, 6,8 ml/perc
Injektor:	280˚C	250˚C	210˚C
Injektálás:	1 µl, 0,7 mg/ml, splitless	Split arány 1:50	0,2 ml, 0,1% oldat, splitless
Detektor:	5973N (MS)	5973N (MS)	FID, 240˚C

1: *Artemisia adamsii* illóolaj, 2: Aromax illóolajok

4.2.2 Statikus gőztéranalízis szilárd fázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME)

A gőztér-analízis (headspace, HS) során az illékony anyagok által képzett légtér összetételét van lehetőségünk meghatározni statikus körülmények között. A módszer első lépéseként a mintát lezárt fiolába helyezik, majd az adott hőmérsékleten annak gőzfázisából mintát gyűjtenek. Az eljárás nagy előnye, hogy automatizálható, illetve külön oldószert nem igényel (3. ábra). A szilárd fázisú mikroextrakció (SPME) a különböző komplex összetételű anyagok egyszerű, gyors, hatékony szilárd fázison történő elválasztását teszi lehetővé. A módszer alkalmas mind az oldatban levő anyagok, mind a minták gőzterének analízisére. A mérés nélkülözhetetlen eleme a kvarcból készült fiber, aminek felületéhez kémiai kötésekkel polimer folyadékfilmet rögzítenek (3. ábra). A gőztér vizsgálata a párolgó komponensek SPME szálhoz való kötődésén, adszorpcióján alapul, amely függ az adott anyag légtérbe való párolgásának sebességétől, valamint a fiberhez való kötődés mértékétől is. Ez utóbbi tényezőt az adott molekula szálhoz való affinitása, valamint mintában lévő koncentrációja egyaránt befolyásolja. Utolsó lépésként az illékony komponenseket tartalmazó SPME szálat a gázkromatográf fűtött injektorába juttatják, ahol a komponensek deszorpcióját követően végezhető el kimutatásuk (Cornu et al. 2001, Kremmer és Torkos 2010)



3. ábra sHS-SPME módszer vázlata (Kremmer és Torkos 2010)

Az eljárást a következő protokoll szerint hajtottuk végre: 10 µl illóolajat 20 ml-es, szilikon/PTFE szeptummal lezárt HS üvegbe mértük. Az analízis során a minta vételezése CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) típusú automata mintavevő alkalmazásával történt. A minta 5 perces 40 és 100°C-on végzett inkubálása után a 65 µm filmvastagságú StableFlex polidimetilsziloxán/divinil-benzol (PDMS/DVB) SPME szálat

(Supelco, Bellefonte, PA, USA) a minta gőzterébe juttattuk, majd az extrakciót 20 percig végeztük 40°C-on és 100°C-on. Ezután az SPME szálat a gázkromatográf injektorába vittük át, ahol a deszorpció 250°C-on történt, 1 percig. Az injektálást split módban kiviteleztük, 1:30 aránnyal. Végül a szálat nagy tisztaságú nitrogén gázban 250°C-on 15 percig tisztítottuk és kondicionáltuk. Az *A. adamsii* illóolajminta esetén SPME analízist nem végeztünk.

4.3 Illóolajok antibakterális hatásának vizsgálata

4.3.1 A vizsgált mikroorganizmusok áttekintése

Kutatásainkba elsősorban olyan humán patogén mikroorganizmusokat vontunk be, amelyek a légutakat érintő kórképek kialakulásában játszanak fontos szerepet. Ezen felül két antibiotikum-rezisztens törzzsel is dolgoztunk, amelyek elsősorban az immunszupresszált betegek körében kiemelt jelentőségűek. A felhasznált légúti baktériumok közül klinikai mintákból izolált törzsek: meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA, 4262) multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa* (R-*P. aeruginosa*, 34205) és *S. pyogenes* (116). Ezen felül német és amerikai törzsgyűjteményből *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus pneumoniae* (DSM 20566), *S. mutans* (DSM 20533), *Haemophilus influenzae* (DSM 4690), *H. parainfluenzae* (DSM 8978), *Moraxella catarrhalis* (DSM 9143) törzseket használtunk fel kísérleteinkben. A baktériumok részletes jellemzését a következőkben ismertetjük.

4.3.1.1 Meticillin-rezisztens *Staphylcoccus aureus*

Staphyloccus genusba tartozó Gram-pozitív 0,5-1,5 µm átmérőjű coccus, amely akár önállóan, akár szőlőfürtre emlékeztető csoportokban jelenik meg. Telepeiben gyakran fedezhető fel aranysárga színű pigment, amelynek nevét is köszönheti. Az emberi kültakaró és a felsőlégutak hámjában egyaránt előfordul, a nozokomiális fertőzések egyik leggyakoribb kórokozója. Számos virulenciafaktorral rendelkezik, amelynek következtében igen változatos kórképeket (bőr- és lágyrész-fertőzések, tüdő- és szívbelhártya gyulladások, ételmérgezések) okoz. Szemben a kórházi törzsekkel (HCA-MRSA: health care-acquired - MRSA) a közösségben szerzett légúti, illetve lágyrész fertőzésekből izolált törzsek (CA-MRSA: community-acquired-MRSA) nagy részében kimutatható a fehérvérsejtek

feloldására képes Panton-Valentine-leukocidin (PVL). Bár a toxin pathogenezisben betöltött szerepe egyelőre nem teljesen tisztázott, valószínűsíthető, hogy szerepük van CA-MRSA törzsek magasabb virulenciájának kialakításában. Sajnálatos tény, hogy manapság egyre gyakrabban izolálnak CA-MRSA típusú törzseket kórházi megbetegedések esetén is. A fertőzések kezelésének fő problémáját a törzs rezisztenciája jelenti a legtöbb penicillin és cefalosporin származékkal szemben, amelyet a baktérium *mecA* génje által kódolt penicillinkötő fehérje (PBP2A: Penicillin Binding Protein 2A) mutációja eredményez. A terápiás alternatívaként felmerülő glikopeptidek (vankomicin, teikoplanin), linezolid, tigeciklin, daptomicin felhasználását nagyban korlátozza, hogy manapság egyre gyakrabban találkozhatunk már ezekre is csökkent érzékenységű, illetve rezisztens törzsekkel. Ígéretes új fejlemény, hogy az 5. generációs cefalosporinok (ceftobiprol, ceftarolin) eredményesen alkalmazhatóak az MRSA baktériummal szemben (Hiramatsu 2001, Que és Moreillon 2010, Gould et al. 2012, Pál 2013).

4.3.1.2 *Pseudomonas aeruginosa,* multirezisztens *P. aeruginosa*

A *Pseudomonas* genus egyik legellenállóbb, igen változatos életkörülményeket is elviselni képes tagja, amely a kórházi fertőzések kb. 10%-áért tehető felelőssé. Morfológiáját tekintve Gram-negatív gyakran nyákot termelő csillós pálca, amelynek telepei jellegzetes hársfára emlékeztető illattal rendelkeznek, valamint termelt pigmentjeinek köszönhetően (pyoverdin, pyocianin) a zöld többféle színárnyalatában jelenhetnek meg a táptalajon. Kórházban fekvő betegek garatából gyakran izolálják, alginát-alapú nyákja révén könnyen tapad meg a légutakban, illetve számos eszköz (pl. katéterek) felületén is. Citotoxinja a sejtek membránjában pórusokat képezve feloldja azokat, pigmentje pedig a légutakban a csillószőrök gátlásán túl, gyulladáskeltő hatású. A törzsek nyáktermelésre, tok-, valamint biofilmképzésre való hajlama a szervezet immunválaszaival szemben igen ellenállóvá teszik őket. Számos virulenciafaktorának köszönhetően szinte bármely szervet képes megfertőzni, ezért nagyon változatos kórképekben (különböző bőrfertőzések, bakteriális keratitis, ízületi és csontvelőfertőzések, húgyúti infekciók, tüdőgyulladás, cisztás fibrosis, szepszis) fordul elő. A terápiás kezelés részei lehetnek, amennyiben az adott törzs érzékeny rá, bizonyos β-laktámok (piperacillin, ticarcillin) β-laktamáz gátlókkal kombinálva, fluorokinolonok és aminoglikozidok. Manapság egyre gyakoribb a még aktív β-laktámokkal szembeni rezisztencia, amely főként a kiterjedt spektrummal rendelkező β-laktamázok (ESBL) gyors terjedésének köszönhető. Ezen kívül a baktérium efflux mechanizmusainak rohamos

fejlődése számos hatásos antibiotikum (kloramfenikol, fluorkinolon, makrolidok, szulfonamidok, tetraciklinek, trimetoprim) terápiás alkalmazását korlátozza. Ennek következtében egyre gyakoribbak az általános kezelésekkel szemben ellenálló multirezisztens törzsek előfordulásai is (Livermore 2002, Cao et al. 2004, Riou et al. 2010, Pál 2013).

4.3.1.3 *Streptococcus pyogenes, S. pneumoniae, S. mutans*

A Streptococcus genus tagjai általános morfológiájukat tekintve Gram-pozitív hosszabb-rövidebb láncokat kialakító coccusok. Közülük a *S. pyogenes* a bőr, lágyrészek, légúti nyálkahártyák gennyes gyulladása esetén izolált leggyakoribb kórokozók egyike. Egy 2005-ben készült tanulmány szerint (Carapetis et al. 2005) a kórokozó egészségügyi jelentősége az elmúlt években sem csökkent, sajnos több mint félmillió haláleset köthető hozzá elsősorban az alacsonyan és közepesen fejlett országokban. Egyik jellegzetes, több funkciót is ellátó virulenciafaktora az M protein, amely főként nekrotizáló fertőzéseket okozó képviselők esetén okoz komoly problémát. Vélhetően az M proteinnek köszönhetően ugyanis hatékonyabban köti a plazminogént, azáltal nagyobb mennyiségben képes előállítani a gyors elterjedéshez nélkülözhetetlen plazmint. Ezen felül természetesen egyéb faktorok (adhezinek, extracelluláris enzimek, toxinok, szuperantigének, opszonizációt gátlók) is szerepet játszanak a baktérium által okozott betegségek patogenezisében. Az invazív fertőzéseket kiváltó képviselőik nem ritkán hialuronsav tokkal rendelkeznek, amely ellenállásukat nagymértékben növeli a terápiában alkalmazott szerekkel szemben. Főként a téli és tavaszi időszakban a kisgyermekek körében gyakori bakteriális torok- és mandulagyulladás egyik meghatározó kórokozója.

A törzsek M proteinjének különbözőségéből adódóan elkülöníthetők kifejezetten pharyngitist okozó típusok is. Az ettől eltérő szerotípussal rendelkező törzsek főként a bőr- és a lágyrészek gyulladásos kórképeiben (impetigo, orbánc, cellulitis) érintettek. Különösen súlyos kórkép a nekrotizáló fasciitis, illetve a streptococcus gangréna, amely esetén a fertőzés a kültakaró mélyebb rétegeinek mentén terjedve roncsolja az izom és zsírszöveteket, aminek következtében nem ritkák a halállal végződő végzetes kimenetelek is. Szuperantigénjeinek (SpeA és SpeC) köszönhetően hasonlóan a staphylococcusokhoz toxikus shock szindrómát képes kiváltani elsősorban legyengült immunrendszerű betegek esetén. Az iskoláskorú gyermekek körében sajnos igen gyakoriak a fertőzéseket követő autoimmun-szövődmények (akut reumás láz, akut streptococcalis glomerulonephritis)

megjelenése. Bár a *S. pyogenes* a penicillin-származékokra még megbízható érzékenységet mutat, fontos szempont a megfelelő mennyiségben és ideig alkalmazandó terápia megválasztása a már említett későbbi szövődmények elkerülése érdekében. Penicillin alkalmazásának akadályba ütközése esetén (pl. penicillin túlérzékenység) a választandó szerek közé tartozik az eritromicin és a klindamicin. Újabb *in vitro* eredmények szerint a kinolon-származék ozenoxacin eredményes terápiás alternatívát jelenthet a fertőzések kezelésére a későbbiekben topikálisan alkalmazva. Fontos megjegyezni, hogy napjainkban az egyes szerotípusok M proteinjén alapuló ígéretes vizsgálatok folynak egy esetleges kórokozó elleni vakcina kifejlesztésére is (Pál 2013, Kanayama et al. 2016, Steer et al. 2016).

A *S. pneumoniae* jelentőségét jól mutatja, hogy még a fejlett országokban is a kórházi és közösségben szerzett pneumoniák egyharmadáért tehető felelőssé, évente világszerte 1,6 millió halálos áldozatot követel (Pál 2013). A kórokozó különösen veszélyeztetett célcsoportjait a fiatal gyermekek, illetve a legyengült immunrendszerű idősebb betegek képezik. Morfológiáját tekintve tokkal rendelkező, nyákos telepeket képző coccus. Az orrüreg és garat nyálkahártyájának jellegzetes tüneteket nem okozó összetevője. Amennyiben a hosszabb ideig kolonizáló baktériumok a szervezetben olyan helyre jutnak ahonnan nem eliminálhatók, könnyen válthatnak ki gyulladásos kórképeket. Számos virulenciafaktorának köszönhetően a már említett pneumonián kívül a középfül- és melléküreg-gyulladások 50%-ért felelős. Terápiájában az elsőként választandók a penicillin és cefalosporin-származékok, ezek hiányában makrolidok, fluorokinolonok indokolt esetben vankomicin alkalmazása javasolt. Napjainkban az izolált törzsek penicillin származékokkal szembeni csökkent érzékenysége elsősorban a baktériumok PBP mutációjához köthető. Megelőzésük tekintetében fontos kiemelni, hogy több különböző, a tok poliszacharidjain alapuló és konjugált vakcina áll jelenleg rendelkezésünkre, illetve további fejlesztések is folynak a minél átfogóbb védelem kialakítása érdekében (Pál 2013, Valente et al. 2016, Charles et al. 2016).

A *S. mutans* a szájüreg, garat normál flóráján kívül a bélcsatornában és a húgyutakban is előforduló kórokozó. Főként szájüregi kórképek esetén érintett, a fogszuvasodás kialakulásának egyik fontos eleme. A baktériumok a foglepedék glikoprotein-receptoraihoz tapadva a táplálék szénhidrátjaiból oldhatatlan glukánokat állítanak elő, amelyek segítségével a fogak felszínén megtapadva biofilmet képeznek. Ezután nagy mennyiségű tejsavat előállítva a fogállomány demineralizációjához és szuvasodáshoz vezetnek. Bár a baktérium főként a szájban lokalizálódik, könnyedén bekerül akár a kisebb fogászati

beavatkozások során is a véráramba. Amennyiben az érintett egészséges immunrendszerrel rendelkezik, a mikrobák rövid időn belül eltűnnek, azonban ha a szervezetben van a megtapadásukhoz alkalmas felület, illetve a beteg csökkent védekezőképességű, komolyabb kórképeket is eredményezhetnek. A törzsek penicillinnel szemben egyre csökkenő érzékenységűek, azonban aminoglikoziddal kombinálva szinergista hatásuk miatt eredményesen használhatók a terápiában. Súlyosabb esetek kezelésében indokolt lehet 3. generációs cefalosporin-származékok, illetve vankomicin alkalmazása is.

Újabb vizsgálatok szerint egyes növényi kivonatok, mint a részlegesen fermentált Assam tea extraktuma eredményesen alkalmazható a baktérium biofilmképzésének megakadályozására. A kutatók a tea pozitív hatását főként (katechin-típusú) cserzőanyag komponenseinek tulajdonították. Hasonló protektív hatás volt kimutatható xylit, cukor helyett való használata estén is (Pál 2013, Kawarai et al. 2016, Salli et al. 2016).

4.3.1.4 *Moraxella catarrhalis*

A felső légutak normál flórájában előforduló Gram-negatív coccobacillus. Elsősorban az arc melléküregei és a fül gyulladásos kórképeinek kialakulásában van szerepe. Kisgyermekek és fiatalok körében kialakuló akut otitis media-ban a megbetegedések 15-20%-áért felelős. Krónikus tüdőbetegségben szenvedőkben, illetve legyengült immunrendszerrel rendelkezők körében gyakran vált ki bronchitist és bronchopneumoniát is. COPD-s (krónikus obtruktív tüdőbetegség) betegek esetén feltételezhetően szintén nagy szerepe van az exacerbáció (fulladás, fokozott köpetürítés és köpetpurulencia) kialakulásában. Bár a legtöbb antibiotikummal szemben érzékeny, β-laktamáz enzimének köszönhetően az egyszerű penicillin-származékok hatástalanok vele szemben. Az antibakteriális terápia során főként makrolidok, fluorokinolonok és doxiciklin alkalmazása jöhet számításba, azonban bizonyos esetekben hatásos lehet még a laktamáz gátlókkal kombinált amoxicillin kezelés is. Sajnos a túlzott, illetve helytelenül megválasztott gyógyszeres kezeléseknek köszönhetően manapság ezen baktérium esetén is egyre gyorsabban alakul ki rezisztencia a β-laktám antibiotikumokkal szemben (Murphy és Parameswaran 2009, Pál 2013, Sheikh et al. 2014).

4.3.1.5 *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*

A légutak normál flórájának Gram-negatív apró coccobacillusai, ideális növekedésükhöz különböző faktort, NAD-ot és hemet (V és X faktorok) igényelnek. A *H. influenzae* legtöbb

képviselője nem tipizálható (NTHi: non-typeable *Haemophilus influenzae*), tokkal nem rendelkező baktérium, azonban előfordulnak komoly problémákat kialakító, tokot képző humán patogén törzseik is (pl. *H. influenzae* „b"). Adhezinjeik, lipopoliszacharidjuk (LPS) illetve külső membránfehérjéiknek köszönhetően általában a nyálkahártyák sejtjeihez könnyen képesek tapadni, ennélfogva a *S. pneumoniae* mellett az otitis media, sinusitis második leggyakoribb okozói. COPD-ben illetve cisztás fibrózisban szenvedők esetén gyakran izolálhatók a betegek alsó légutaiból, idősek, illetve legyengült immunrendszerrel rendelkezők körében a közösségben szerzett pneumonia egyik meghatározó kórokozói (Sethi et al 2006). Mivel az NTHi törzsek adhezinjeinek, illetve külső membrán fehérjéinek szerkezete mutációval könnyen változik, így fertőzés során a szervezetben kialakuló védettség sajnos csak a törzsek egy szűk spektrumával szemben lesz eredményes. A tokkal rendelkező *H. influenzae* „b" meningitist kiváltva nem ritkán maradandó idegrendszeri károsodást, illetve az epiglottis gyulladásának kiváltása okán fulladásos halált is képes okozni. Szerencsére ma már ennek megelőzése érdekében a baktérium ezen típusával szemben kötelező védőoltás van érvényben (Hib oltás), amely tok poliszacharidot tartalmaz. A *H. parainfluenzae* szintén a légutak flórájának jellegzetes alkotója, súlyos esetekben szívbelhártya gyulladást képes indukálni önmagában vagy más kórokozókkal társulva.

Haemophilus fertőzések esetén, amennyiben a törzs nem β-laktamáz termelő, az elsőként választandó szerek a penicillin- és cefalosporin-származékok. Ezek akadályoztatása esetén amoxicillin/klavulánsav kombináció, illetve makrolidok és fluorokinolonok jöhetnek számításba. Súlyos szisztémás fertőzések esetén 3. generációs cefalosporin alkalmazása és a légutak átjárhatóságának biztosítása a legfontosabb. Európában és Ázsiában az utóbbi tíz évben sajnálatosan egyre gyakoribb az ampicillin-rezisztens törzsek előfordulása, amelynek oka főként a baktérium penicillinkötő fehérjéjében (PBP3) bekövetkező mutáció. Ezen felül az antibiotikummal szembeni csökkent érzékenységért tehetők felelőssé az egyre több törzs által termelt β-laktamázok és a baktériumok eredményes efflux mechanizmusai is. Ennek köszönhetően a makrolidok és a β-laktám antibiotikumok nagy részének alkalmazása jelentősen lecsökkent napjainkra. Ígéretes vizsgálatok folynak jelenleg az NTHi törzsek elleni immunizálás tekintetében, a baktériumtörzs felszíni fehérjéinek kombinációit védőoltásokban használva (Pál 2013, Koshkelashvili et al. 2016, Wajima et al. 2016, Forstner et al. 2016, Leroux-Roels et al. 2016).

4.3.2 Tesztbaktériumok antibiotikum érzékenységének meghatározása

A mikroorganizmusok antibiotikum érzékenységének meghatározására Kirby-Bauer korongdiffúziós módszert alkalmaztuk CLSI és a Manual of Clinical Microbiology által leírt követelményeknek megfelelően. A módszer a 3.3.1. fejezetben ismertetetteken alapul, a baktérumszuszpenzióval szélesztett táptalaj felületére a gyártó által megadott mennyiségű antibiotikumot tartalmazó papírkorongot helyeztünk. A korongok felhelyezése után 15 percen beül a Petri-csészéket 35±2°C-on inkubáltuk 16-18 órán át, majd látható fényben értékeltük a kialakult gátlási zónákat. *Staphylococcus* törzsek esetén az oxacillin- és vankomicin-rezisztencia kimutatásához szükséges 24 órás inkubálási időtartamot tartottuk be. A vizsgálatok során a következő antibiotikumokkal szembeni érzékenységet vizsgáltuk: amikacin (30 µg), amoxicillin/klavulánsav (20/10 µg), ceftazidim (10 µg), cefepim (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), eritromicin (15 µg), gentamicin (30 µg), imipenem (10 µg), kolisztin (10 µg), levofloxacin (5 µg), meropenem (10 µg), oxacillin (1 µg), penicillin (1 µg), piperacillin/tazobaktám (100/10 µg), trimetoprim/szulfametoxazol (1,25/23,75 µg), tobramicin (10 µg), vankomicin (5 µg) (OXOID Ltd.) (Patel et al. 2011).

4.3.3 Az antibakteriális hatás *in vitro* vizsgálómódszerei

In vitro vizsgálataink során a csőhígítás, direkt bioautográfia valamint a gőztéranalízis módszerét alkalmaztuk illóolajaink antimikrobás hatásának értékelésére. Az előbbi két módszer főként az illóolajok folyékony állapotban való vizsgálatára, a mikroorganizmussal való direkt kontaktusára irányult, míg a gőzteres vizsgáltok során az illékony komponensek mikroorganizmusok növekedésére gyakorolt gátló hatását értékeltük. Eredményeinket a csőhígítás és bioautográfia esetén a terápiában is alkalmazott antimikrobás szerek hatásával vetettük össze. Az *A. adamsii* illóolaját a rendelkezésre álló korlátozott mintamennyiség miatt egyedül a direkt bioautográfia módszerével volt lehetőségünk vizsgálni.

4.3.3.1 Direkt bioautográfiás vizsgálatok

Az illóolajok antimikrobás hatásának vizsgálta két elrendezés szerint történt. A vizsgálatok során az illóolajok kromatográfiás elválasztás nélküli antimikrobás hatását értékeltük a kiválasztott mikroorganizmussal szemben, különböző koncentrációkat alkalmazva („A” módszer). Az *A. adamsii* esetén az illóolaj komponenseinek aktivitását vékonyréteg-

kromatográfiás elválasztást követően kíséreltük meg kimutatni („B” módszer). A módszer alapja a 3.3.3 fejezetben ismertetett mechanizmus, az általunk alkalmazott vizsgálati protokoll a következők szerint történt:

Rétegek előkészítése:

„A” módszer: Az Aromax illóolajok 5-10-20-30 mg/ml-es abszolút etanollal (Molar Chemicals Ltd., Halásztelek) készült oldatának 5 µl-ét üvegkapilláris (Hirschmann Laborgerate GmbH & Co. KG, Eberstadt, Germany) segítségével szilikagél rétegre (Merck TLC Silica gel 60 $F_{254,}$ 5x10 cm) vittük fel. A referenciaként alkalmazott antibiotikumokból (vankomicin: Vankomicin 500 mg por oldatos infúzióhoz vagy belsőleges oldathoz, TEVA; polimixin B: Polymixin B sulphate, Sigma Aldrich Ltd.; ciprofloxacin: Ciprinol 2 mg/ml oldatos infúzió, KRKA) steril desztillált víz felhasználásával 0,25-0,5 mg/ml-es törzsoldatokat készítettünk, amelyekből 1 µl került felvitelre a vékonyrétegekre. Az oldószer aktivitásának kizárása érdekében kontrollként 5 µl abszolút etanolt alkalmaztunk.
Az *A. adamsii* illóolajának vizsgálata során, tekintettel a kis mennyiségű illóolajmintára, abszolút etanol segítségével 200 µl/ml-es törzsoldatot készítettünk, amelynek 3 és 5 µl-ét vittük fel a rétegre. Az illóolaj aktivitásának vankomicinnel való összevetéséhez az 1 mg/ml-es törzsoldat 4 µl-ét használtuk fel.

„B” módszer: Az *A. adamsii* illóolaj törzsoldatának 1, 3 és 5 µl-ét pontban 10x10 cm-es szilikagél rétegre vittük fel üvegkapilláris segítségével. Negyedik és ötödik pontban a rétegen az 1,8-cineol és tujon standard (Sigma Aldrich Ltd.) 10 µl/ml-es oldatának 2 µl-ét vittük fel. A rétegeket ezután vékonyréteg-kromatográfiás eljárásnak vetettük alá telített gőzterű kromatográfiás kamrában (CAMAG, Muttenz, Switzerland), a kifejlesztést 8 cm-es fronttávolságig történt. Mobil fázisként toluol és etil-acetát 93:7 (v/v) arányú elegyét alkalmaztuk. Az elválasztást, valamint az ezt követő oldószer elpárologtatását szobahőmérsékleten (22°C) végeztük.

Bioautográfiás folyamatok kivitelezése:

Az „A” vagy „B” módszerekkel előkészített réteglapok mikrobiológiai vizsgálata ezután nem különült el. Első lépésként az előzetesen folyékony táptalajba oltott baktérium-szuszpenzió optikai denzitásának beállítása történt 600 nm-en 0,4-hez közelítő értékre a

megfelelő csíraszám elérésének érdekében (~$4x10^7$ CFU/ml). Ezután a rétegeket 10 másodpercig a szuszpenzióba merítettük, majd párakamrában (20×14.5×5 cm) 37°C-on 17 órán át inkubáltuk. A detektáláshoz alkalmazott MTT festék [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid, Sigma Aldrich Ltd., Budapest] 50 mg/80 ml koncentrációjú vizes oldatába az inkubációs idő letelte után a rétegeket 10 másodpercig merítettük, majd újabb 2 órára a párakamrába helyeztük őket. Az értékelést ezt követően látható fényben végeztük. A réteglapokat Canon PowerShot A95 típusú digitális fényképezőgéppel archiváltuk. A gátlási zónák átmérőit Motic Images Plus 2.0 programmal értékeltük ki. Minden esetben három párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

4.3.3.2 A csőhígítás módszere

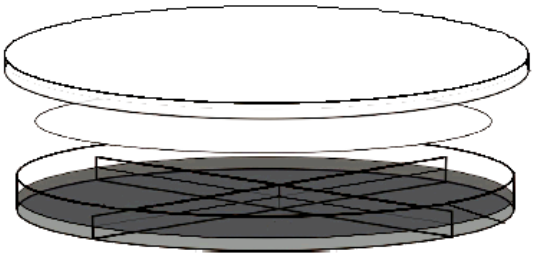
A tesztrendszer kidolgozása a Manual of Clinical Microbiology (2011) előírása, valamint Végh és munkatársai (2012) publikációjának figyelembe vételével történt. Az Aromax olajai és a mikroorganizmusnak megfelelő folyékony Müller-Hinton (MHA) táptalaj segítségével 50 µl/ml-es kezdő koncentrációból kiindulva felező módszerrel hígítási sorozatot készítettünk 0,0075 µl/ml végkoncentráció eléréséig. A kísérlet megkezdését megelőzően minden illóolajat a kontaminációk kiküszöbölésének céljából Millex-GV filteren szűrtünk át (filter unit: 0,22 µm, Millipore, Ireland). Itt fontos megjegyezni, hogy ez a lépés nem befolyásolta az illóolaj-összetételt, amelyet GC-MS módszerrel ellenőriztünk is. Az illóolaj homogén eloszlásának érdekében 10%-os Tween 80 oldat (Reanal Kft., Budapest) 20 µl-ét adagoltuk a hígítás megkezdése előtt a kezdő koncentrációhoz. *Moraxella catarrhalis* esetén a Tween 80 nem volt alkalmazható, mivel gátló hatást mutatott a baktériummal szemben, ezért frissen desztillált dimetil-szulfoxid (DMSO, Reanal Kft., Budapest) 10%-os oldatát használtuk fel a poliszorbáttal megegyező módon. Előkísérleteink szerint ilyen koncentrációban a DMSO nem zavarta a baktériumok szaporodását. A hígítást követően minden csőhöz $4x10^7$ CFU/ml csíraszámú baktérium-szuszpenzió 10 µl-ét adtuk, majd homogenizáltuk a csövek tartalmát. Negatív kontrollként kezeletlen, valamint 20 µl szolubilizáló szert tartalmazó táptalajt alkalmaztunk, amelyet ugyanakkora mennyiségű baktérium-szuszpenzióval oltottunk be. *H. influenzae* és *H. parainfluenzae* esetén a mikrobák növekedéséhez szükséges faktorokat (X és V faktor, Bacto Supplement B, DIFCO, USA) 15 µg/ml-es koncentrációban alkalmaztuk a táptalajhoz adva (Hindler és Jorgensen 2011).

A referencia antibiotikumok aktivitásának tesztelése hasonló elrendezéssel valósult meg, 100 µg/ml-es koncentrációból kiindulva. Ebben az esetben szolubilizáló szert nem alkalmaztunk, kontrollként baktériummal beoltott kezeletlen táptalajt használtunk. Összehasonlítás céljából vankomicin (Vankomicin 500 mg por oldatos infúzióhoz vagy belsőleges oldathoz, TEVA), gentamicin (Gentamicin Sandoz 80 mg injekció, Sandoz), imipenem (Imipenem/Cilastatin Kabi 500 mg/500 mg por oldatos infúzióhoz), amoxicillin/klavulánsav (Aktil 1000 mg/200 mg por oldatos infúzióhoz, Richter Gedeon) és amikacin (Likacin 250 mg/ml oldatos injekció, Lisapharma S.p.A.) antibiotikumokat alkalmaztunk.

A csöveket alapos homogenizálást követően 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, majd 10 µl-t újabb alapos kevertetést követően a mikroorganizmusnak megfelelő szilárd MHA, 5% defibrinált vért tartalmazó véres agar, illetve csokoládé agar felszínére szélesztettük. A szilárd táptalajokat ezután újabb 48 órán át ismét 37°C-os inkubálásnak vetettük alá. Ezt követően került meghatározásra az adott minta mikroorganizmussal szembeni minimális gátló (MIC), valamint minimális baktericid koncentrációja (MBC). Minden esetben három párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

4.3.3.3 A vapor phase technika paraméterei

Vizsgálataink a 3.3.4 fejezetben részletesen tárgyalt, Kloucek és munkatársai (2012b) által bemutatott vapor phase technikán alapultak. Eltérésként megemlítendő, hogy táptalajt nem öntöttünk az általunk használt Petri-csésze tetejébe, mivel a mintát tartalmazó szűrőpapírkorong könnyen megtapadt a felszínén, csökkentve ezzel a komponensek párolgását. A kísérleteink során a gőztér kifejlesztése négyosztatú 90 mm átmérőjű Petri-csészében (VWR, Debrecen) történt, amelynek minden rekeszébe 5 ml-nyi megfelelő táptalaj került öntésre (4. ábra). *Pseudomonas* törzsek és MRSA esetén MHA táptalajt, a *Streptococcus* törzsek és *M. catarrhalis* esetében 5%-os birka véres agart, a *Haemophilus*ok és *S. mutans* vizsgálatához csokoládé agart használtunk. A baktériumokból előzetesen 0,9%-os fiziológiás sóoldat segítségével 10^5 CFU/ml csíraszámú szuszpenziót készítettünk, amelynek 20 µl-ét szélesztettük a Petri-csésze egy-egy osztatába. Fontos kiemelni, hogy egy vizsgálat során egyszerre három különböző mikrobát vizsgáltunk, ennek megfelelően a Petri-csésze negyedik osztatát kezeletlen kontrollként, munkánk tisztaságának, valamint vizsgálati anyagaink esetleges kontaminációjának ellenőrzése céljából szabadon hagytuk.



4. ábra A gőztér analízishez használt *in vitro* tesztrendszer vázlata (Kloucek et al. 2012b)

Az illóolajmintákat abszolút etanolban hígítva elkészítettük a megfelelő koncentrációjú törzsoldatot (0,5-195 µl/ml), amelyből 500 µl-t 84 mm átmérőjű (vastagság: 0,18 mm) szűrőpapírkorongra (Albet-Hahnemühle, Germany) vittünk fel. Az oldószert ezután fél percig szobahőmérsékleten elpárologtattuk, majd a korongot a Petri-csésze rekeszeinek osztatára helyeztük. Illóolajaink így közvetlenül a táptalaj felszínével nem kerültek kapcsolatba, csupán az általuk kialakított légtér komponensei gátolták a mikrobák növekedését. A Petri-csészék felszínét parafilmmel (Sigma Aldrich Ltd., Budapest) zártuk le az esetleges párolgás megakadályozása érdekében. A csészéket ezt követően 37°C-on 48 órán át inkubáltuk, majd látható fényben értékeltük meghatározva az adott minta MIC értékét.

4.4 Illóolajok és illó komponenseik kölcsönhatásának vizsgálata

Az illóolajok és komponenseik kombinációjának vizsgálatához a 3.4.1 fejezetben ismertetett checkerboard-titrálás, valamint a direkt bioautográfia módszerét alkalmaztuk. A kísérletet az aktibakteriális hatás tesztelésénél kapott eredmények tükrében a fahéjkéreg, szegfűszeg, kakukkfű, citronella, borsmenta illóolaja, valamint főkomponenseik a *transz*-fahéjaldehid, eugenol, timol, mentol, geraniol, citronellál és citrál (geraniál és nerál keveréke) (Sigma Aldrich Kft.) kombinációival végeztük. A vizsgáltokba bevont törzsek: MRSA (4262), R-*P. aeruginosa* (34205), valamint *P. aeruginosa* (ATCC 27853) voltak.

4.4.1 A direkt bioautográfiás módszer vizsgálati körülményei

A vizsgálatok során elsőként az adott mikroorganizmus esetén antibakteriális hatással rendelkező komponensek kimutatását, majd azok minimális detektálható dózisának (MDD)

meghatározását végeztük el. Minimális detektálható dózisnak tekintjük az adott komponens rétegre felvitt legkisebb mennyiségét, amely jól látható, tiszta gátlási zónát hoz létre az adott baktériumtörzs esetén (Botz et al. 2001). A hatékony komponensek kombinációinak kölcsönhatását ezután direkt bioautográfiás módszerrel értékeltük.

4.4.1.1 Mikrobiológiailag aktív komponensek meghatározása

Az adott illóolaj 100 µl-ének 500 µl abszolút etanollal készült törzsoldatából, valamint a főkomponensek 40 mg/µl-es oldatából 0,6 µl-t 20x10 cm-es szilikagél rétegre vittünk fel automata pipetta segítségével (Finnpipette, Thermo Fisher) 2 párhuzamos elrendezésben. A rétegeket telített gőzterű kromatográfiás kamrában fejlesztettük ki 8 cm-es fronttávolság eléréséig. Mobil fázisként fahéjolaj kivételével minden esetben a toluol és etil-acetát 93:7 (v/v) arányú elegyét használtuk. Fahéjolaj esetén a mozgófázis etanollal stabilizált metilén-klorid volt (Molar Chamicals Kft.). Az elválasztást, valamint az ezt követő oldószer elpárologtatását szobahőmérsékleten (22°C) végeztük, majd megfeleztük a rétegeket.

A rétegek egyik felével a 4.3.3.1. fejezetben leírt bioautográfiás folyamatokat hajtottuk végre, a festés előtti inkubációs időt 4 órára csökkentve. A réteglapokat Canon PowerShot A95 típusú digitális fényképezőgéppel archiváltuk. Minden esetben két párhuzamos vizsgálatot végeztünk. A rétegek másik felét vanillin-kénsavas előhívó elegybe (Ph.Hg. VIII.) merítettük, 95°C-os szárítószekrénybe helyeztük 5 percre, majd látható fényben értékeltük őket.

4.4.1.2 Minimális detektálható dózis meghatározása

A gátlási zónát eredményező aktív komponensek 10-20-30-40-50-60 mg/ml koncentrációjú abszolút etanollal készült törzsoldatainak 0,2-0,4-0,6-0,8-1,0-1,2-1,5 µl-es mennyiségét ezután 5x10 cm-es szilikagél rétegre vittük fel automata pipetta segítségével. Ezután az előbbiekben a posztkromatográfiás folyamatok esetén leírtakat hajtottuk végre, megtartva az MTT oldatba való merítés előtti 4 órás inkubációs időtartamot. Megemlítendő, hogy itt kromatográfiás elválasztás nem történt, mivel egy-egy kompones aktivitását teszteltük. A rétegeket ezután látható fényben értékeltük. Minden vizsgálatot 3 párhuzamos elrendezés szerint végeztünk.

4.4.1.3 A kölcsönhatást vizsgáló módszer paraméterei

Az előzetes vizsgáltok alapján a 4. táblázatban összefoglalt kombinációk kölcsönhatásainak vizsgálatára került sor. A kombinációk kiválasztása során célunk volt olyan erős és mérsékelt aktivitással rendelkező komponensek kölcsönhatásának vizsgálata, amelyekkel kapcsolatban még kevés tapasztalat áll rendelkezésünkre.

4. táblázat: Direkt bioautográfiás módszerrel vizsgált illóolaj-komponens kombinációk

Baktériumtörzs	**Kombinációk**
MRSA	eugenol-mentol, *transz*-fahéjaldehid-mentol, timol-mentol, geraniol-timol
P. aeruginosa	eugenol-mentol, *transz*-fahéjaldehid-mentol, timol-mentol, geraniol-timol, citrál-timol, citronellál-timol, citronellál-citrál, citrál-geraniol, citronellál-geraniol
R-*P. aeruginosa*	*transz*-fahéjaldehid-timol, eugenol-timol, *transz*-fahéjaldehid-eugenol

A kombinált mintákat és összetevőiket külön-külön pontban 5x10 cm-es szilikagél rétegre vittük fel automata pipetta segítségével. Ezután az MDD meghatározásánál is említett bioautográfiás eljárásnak megfelelően kezeltük a rétegeket. Minden esetben 4 párhuzamos vizsgálatot végeztünk. A réteglapokat Canon PowerShot A95 típusú digitális fényképezőgéppel archiváltuk, a gátlási zónák átmérőit Motic Images Plus 2.0 programmal értékeltük ki.

4.4.2.Statisztikai analízis

A direkt-bioautográfiás kölcsönhatás vizsgálatok eredményeinek statisztikai analízisét R Studio 1.1.383 (R verziószám: 3.4.3) program Mann-Whitney-Wilcoxon tesztje segítségével végeztük el. A vizsgálatok célja a kombinációk eredményességének detektálása, vagyis az önálló komponensek gátlási zónáitól való pozitív eltérés kimutatása volt. A nem parametrikus teszt elsősorban a kis elemszámú, nem normál eloszlást követő vizsgálatokban alkalmazható, így vizsgálatunk eredményeire is megfelelőnek bizonyult. A tesztek során a mérési eredményeket rangszámokkal láttuk el, majd meghatároztuk az adott mintát jellemző empirikus értéket, amelyet a próbához tartozó kritikus értékkel vetettünk össze a minták

elemszámától függően. Ez az érték meghatározza azt az intervallumot, amelyen kívül eső rangszámösszeg esetén a különbség szignifikánsnak tekinthető (Hollander és Wolfe 1999). Az elemzés során a nullhipotézis H_o:$\mu_{kombinációZOI}$- $\mu_{komponensZOI}$=0, az alternatív hipotézis H_1: $\mu_{kombinációZOI}$- $\mu_{komponensZOI}$>0 volt.

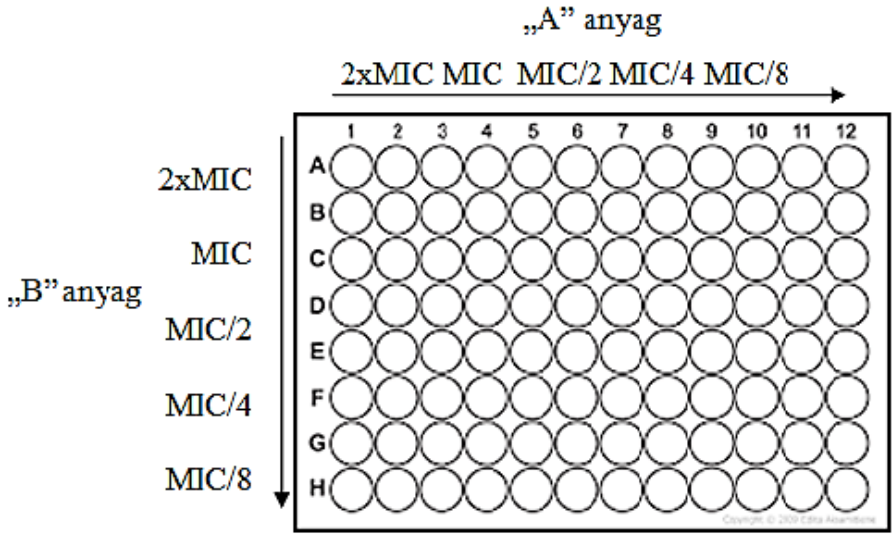
4.4.3 A checkerboard-titrálás vizsgálati körülményei

4.4.3.1. MIC értékek meghatározása

A módszer alapjai megfelelnek a 3.4.1 fejezetben ismertetettekkel. A vizsgáltok során az eredményesnek talált fahéjolajjal, szegfűszegolajjal, citronellaolajjal, bormentaolajjal és kakukkfűolajjal valamint ezek fő illóolaj komponenseivel készült kombinációkat checkerboard-titrálásos módszerrel teszteltük *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ellen. A vizsgálatok a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszékével együttműködésben történtek. Rezisztens humán patogén baktériumtörzsekkel ebben a tesztrendszerben nem volt lehetőségünk kísérletek elvégzésére. A vizsgálatok során elsőként az adott komponens, illetve illóolaj MIC értékének meghatározását végeztük el. MIC értéknek tekintettük a csőhígításos tesztekhez hasonlóan azt a legkisebb koncentrációt, amely még megakadályozta az adott mikroorganizmus szaporodását. Ezen érték meghatározásához a baktériumot MHA táptalajon 37°C-os hőmérsékleten tenyésztettük a korai stacioner fázisban lévő 10^5/ml sejtszám elérése céljából. A vizsgálati anyagok koncentráció-tartománya 100-0,1 mg/ml között volt. A mikroorganizmusok szuszpenziójából 100 µl-t adva a 100 µl mennyiségű vizsgálati mintát tartalmazó tápközegekhez, a tenyészeteket 24 órán át inkubáltuk 37°C-on. A mérések 96 cellás steril, polisztirol mikrotiter lemezekben (VWR International Kft.) történtek. Az illó komponenseket nem tartalmazó sejtszuszpenziós tápoldat pozitív kontrollként, a sejtmentes tápoldat negatív kontrollként szolgált. Ezt követően 600 nm-en mértük a minták abszorbanciáját mikrotiterlap olvasóval (SPECTROstar Nano Microplate reader, BMG Labtech). Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol a pozitív kontroll abszorbanciájához képest ± 10%-ra csökkent értékeket mértünk. A vizsgálatok 2 párhuzamos elrendezés szerint történtek.

4.4.3.2. A checkerboard-titrálás paraméterei

A mérések 3 párhuzamosban történtek 96 cellás steril, polisztirol mikrotiter lemezekben, mintahelyenként 200 µl végtérfogatban. Egy mintahely 50-50 µl MHA tápoldatban oldott, adott koncentrációjú vizsgálandó anyagot valamint 100 µl korai stacioner fázisban lévő 10^5/ml sejtszámú szuszpenziót tartalmazott. A tesztekhez az illóolajok és komponenseik törzsoldataiból felező hígítási sort készítettünk 1%-os Tween 40 oldat (Sigma Aldrich Kft.) és MHA táptalaj segítségével 2x MIC, MIC, MIC/2, MIC/4 és MIC/8 koncentrációkban. A mikrotiter lemezen a hatóanyagok kombinációja ellentétes irányban csökkenő koncentrációk szerint valósult meg (5. ábra). A lemez elkészítése után 24 órás inkubáció következett 37°C-on. Ezt követően az abszorbanciaértékeket 600 nm-en mértük ez előbbiekben említett mikrotiterlap olvasóval. Kontrollként illó komponenst nem tartalmazó baktérium szuszpenziót, valamint sejtmentes táptalajt alkalmaztunk.



5. ábra: A checkerboard-titrálás mikrotiter lemezének sematikus ábrája

Egy kombinációt egy lemezen 4 párhuzamos mérésben vizsgáltunk. Az eredményeket két független párhuzamos mérésből nyertük. Ahhoz, hogy a két hatóanyag közötti kölcsönhatás típusát megállapíthassuk a 3.4.1. fejezetben leírtaknak megfelelően frakcionális gátló koncentráció indexet (FICI) számítottunk ki. Amennyiben a FICI ≤0,5 a két szer közötti kölcsönhatást szinergistának, 0,5<FICI<1 közötti érték esetén additívnak, FICI>4 esetén antagonistának tekintettük. Ha a FICI 1 és 4 közé eső érték, a komponesek között nem volt kölcsönhatás kimutatható (Langeveld et al. 2014, Clemente et al. 2016, Ghabraine et al. 2016).

5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

5.1 Az *Artemisia adamsii* illóolaj-tartalmának meghatározása

A drogból desztillált illóolaj mennyisége 0,56 ml volt 100 g abszolút száraz drogra vonatkoztatva. Az *Artemisia* nemzetségre jellemző, hogy a legtöbb képviselőjükben előforduló proazulénekből a vízgőz-desztilláció során kékes-zöld színű azulének keletkeznek, amelyek az illóolaj jellegzetes színét eredményezik (Rácz et al. 2012). Az általunk végzett desztilláció során az illóolaj jellegzetes ürmös illatú és halványsárga színű volt eltérően a nemzetség más tagjaiétól. Ebből következően feltételeztük, hogy a drog nem tartalmaz proazulén-származékokat, amely feltevésünket a későbbi gázkromatográfiás vizsgálatok is megerősítették.

5.2 Az analitikai vizsgálatok eredményei

5.2.1 A GC-FID és GC-MS analízis eredményei

Az A. adamsii illóolajának vizsgálata:

Nagyon kevés, illetve régi irodalom áll rendelkezésre az *A. adamsii* illóolajának pontos kémiai összetételével kapcsolatban, ezért mindenképpen indolkolt az adatok bővítése főként illóolajának tekintetében (Bohlmann 1985, Satar 1986).

5. táblázat Az *A. adamsii* illóolaj összetétele gázkromatográfiás mérés alapján

Komponensek	**Retenciós idők (min)**		**Komponensek mennyisége (FID, %)**
	FID	MS	
p-cimol	7,7	8,1	1,5
1,8-cineol	7,9	8,3	15,2
linalool	9,8	7,8	0,4
α-tujon	10,4	10,6	64,4
β-tujon	10,7	11,0	7,1
terpinén-4-ol	11,7	13,1	1,5
spatulenol	18,0	25,0	1,8
Összesen (%):			**91,9**

(RSD < 4,5%)

Az illóolaj fő komponenseként *α*-tujon volt azonosítható (64,4%). Ezen felül kisebb mennyiségben 1,8-cineol, *β*-tujon, *p*-cimol, linalool, terpinén-4-ol és spatulenol jelenlétét sikerült kimutatni. Az összetevők százalékos megoszlását az 5. táblázat foglalja össze.

Ellentétben korábbi publikációkkal, esetünkben a limonén komponens nem volt detektálható az illóolajban (Satar 1986), amely vélhetően a gyógynövény begyűjtési helyének eltéréseiből adódhatott.

Az Aromax illóolajok vizsgálata:

A vizsgálatok során mindegyik illóolaj esetében a komponensek több mint 96%-át sikerült azonosítanunk (6. táblázat). A fahéjkéreg illóolaja esetén a fő komponens a *transz*-fahéjaldehid volt (74%), kisebb mennyiségben (1,4-5,3%) eugenol, limonén, 1,8-cineol, fahéj-acetát és linalool komponensek fordultak elő. A citronella esetén a citronellal (36,2%) volt kimutatható, mint fő komponens, azonban nagyobb mennyiségben (13,6-25,3%) citronellol és geraniol is megtalálható volt az illóolajban. A szegfűszeg olajának eugenol komponense 88,6%-ban, míg az eukaliptusz olajában az 1,8-cineol (= eukaliptol) 84,8%-ban volt jelen. Korábbi irodalmakhoz képest (Tisserand és Young 2014) kis eltérés mutatkozott eukaliptusz mintánk *α*-pinén és *p*-cimol tartalmában. A borsmenta illóolaja 50,4%-ban mentolt tartalmazott fő komponensként, származékait kisebb százalékban szintén sikeresen azonosítottuk. Mintánk izomentol komponensének mennyisége (4,3%) meghaladta az irodalomban megadott határértékeket (0,2-1,2%) (Tisserand és Young 2014). Az erdeifenyő olajban *α*-pinént azonosítottuk fő komponensként, azonban kamfén-, és limonén-tartalmára vonatkozóan jelentős eltéréseket tapasztaltunk a korábbi publikációk eredményeihez képest (Tisserand és Young 2014).

A kakukkfű illóolajában a timol volt kimutatható a legnagyobb mennyiségben (46,3%). Az illóolaj linalool és *p*-cimol összetevője nagyobb százalékban, míg karvakrol és γ-terpinén alkotója a korábban közölt irodalmi adatokhoz képes kisebb mennyiségben volt jelen (Tisserand és Young 2014). Természetesen az illóolajok összetételét a genetikai tényezőkön kívül a környezeti hatások is jelentősen befolyásolják. Mivel a mérési paramétereink eltértek a Magyar Gyógyszerkönyvben megadott paraméterektől, ezért a gyógyszerkönyvi értékekkel saját mérési eredményeinket nem tudtuk összevetni.

6. táblázat A fahéjkéreg (1), a citronella (2), a szegfűszeg (3), az eukaliptusz (4), a borsmenta (5), az erdeifenyő (6) és a kakukkfű (7) illóolajok összetételének gázkromatográfiás eredményei

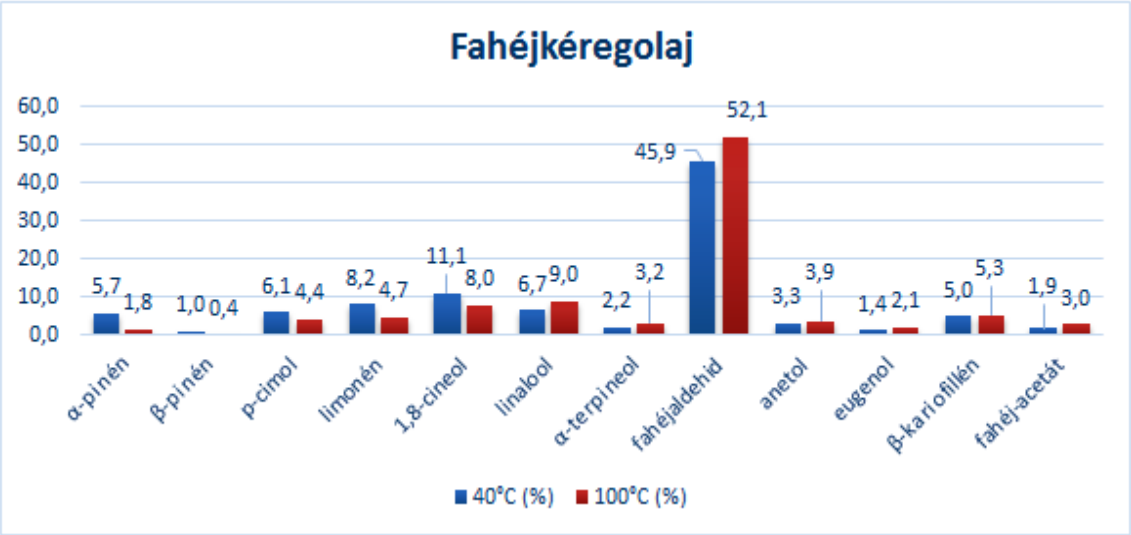
Komponensek	**Retenciós idők (min)**		**Komponensek mennyisége (FID, %)**						
	MS	**FID**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
α-pinén	5,9	5,7	0,5	-	-	1,1	1,1	**39,4**	0,9
kamfén	6,3	6,2	-	-	-	-	-	0,8	0,9
fenkon	6,4	6,6	-	-	-	-	-	1,1	-
β-pinén	6,9	6,7	-	-	-	0,5	0,6	11,0	1,4
δ-3-karén	7,6	7,0	-	-	-	-	-	7,0	-
α-terpinén	7,7	7,2	-	-	-	-	-	-	2,2
limonén	7,9	7,4	1,4	3,5	-	6,4	1,4	14,3	-
p-cimol	7,8	7,6	1,2	-	-	6,9	0,2	-	22,1
1,8-cineol	8,0	7,9	2,1	-	-	**84,8**	5,5	-	9,8
γ-terpinén	8,6	8,5	-	-	-	-	-	-	0,3
linalool	10,1	10,1	3,8	-	-	-	-	-	5,1
nerál	10,3	10,2	-	1,0	-	-	-	-	-
citronellál	10,4	11,0	-	**36,2**	-	-	-	-	-
izopulegon	10,5	11,1	-	-	-	-	1,0	-	-
geranial	10,7	11,2	-	2,2	-	-	-	-	-
menton	10,6	11,2	-	-	-	-	19,8	-	-
izomenton	10,8	11,5	-	-	-	-	7,0	-	-
izomentol	10,9	11,6	-	-	-	-	4,3	-	-
terpinén-4-ol	11,5	11,7	-	-	-	-	-	-	0,6
mentol	11,1	11,9	-	-	-	-	**50,4**	-	-
α-terpineol	11,4	12,3	1,5	-	-	-	-	8,8	-
borneol	11,0	12,4	-	-	-	-	-	-	1,0
citronellol	11,9	12,9	-	13,6	-	-	-	-	-
mentil-acetát	13,1	13,0	-	-	-	-	5,5	-	-
bornil-acetát	13,0	13,0	-	-	-	-	-	3,4	-
geraniol	12,4	13,4	-	25,3	-	-	-	-	-
anetol	13,1	13,5	2,3	-	-	-	-	-	-
piperiton	12,6	13,8	-	-	-	-	0,8	-	-
mentofurán	16,7	13,9	-	-	-	-	0,2	-	-
citronellil-acetát	14,1	14,1	-	2,3	-	-	-	-	-
geranil-acetát	14,5	14,2	-	2,6	-	-	-	-	-
longiferén	15,3	14,4	-	-	-	-	-	0,5	-
β-elemén	14,9	14,7	-	2,9	-	-	-	-	-
β-kariofillén	15,4	14,8	1,7	-	8,6	-	0,4	8,4	2,5
transz-fahéjaldehid	12,9	14,9	**74,0**	-	-	-	-	-	-
α-humulén	16,0	15,4	-	-	2,2	-	-	0,8	-
timol	13,2	15,6	-	-	-	-	-	-	**46,3**
eugenol	14,3	15,8	2,7	-	**88,6**	-	-	-	-
β-kubebén	16,4	15,8	-	0,9	-	-	-	-	-
karvakrol	13,3	15,9	-	-	-	-	-	-	3,2
β-kadinén	17,0	16,0	-	1,0	-	-	-	-	-
elemol	17,4	16,4	-	2,4	-	-	-	-	-
fahéj-acetát	15,8	16,9	5,3	-	-	-	-	-	-
eudesmol	19,1	18,3	-	2,3	-	-	-	-	-
kariofillén-oxid	18,0	18,8	-	-	0,5	-	0,1	0,7	-
Összesen (%):			**96,5**	**96,2**	**99,9**	**99,7**	**98,3**	**96,2**	**96,3**

(RSD < 4,5%)

5.2.2 Az sHS-SPME-GC-MS eredményei

A vizsgálat során a minták analízise 40°C-on és 100°C-on valósult meg, így detektálva a gőztérbe párolgó komponensek jelenlétét és mennyiségét. A 40°C-os vizsgálat a későbbiekben bemutatandó vapor phase mikrobiológiai vizsgálatok szempontjából jelentős, mivel a mikrobiológiai gőzteres vizsgálatoknál ezt megközelítő 37°C-os inkubációs hőmérsékletet alkalmaztunk. A GC vizsgálattal ezen gőztér összetételét kívántuk meghatározni. A 100°C-os inkubációs hőmérséklet a GC-FID technikához hasonlóan jellemző az illóolajok vizsgálatára. Az sHS-SPME-GC-MS eredményének értékelő diagramjait a 6.-12. ábrák mutatják be, amelyeken az 1% feletti mennyiségben kimutatott komponensek százalékos jelenlétét hasonlítottuk össze a két különböző hőmérséklet esetén.

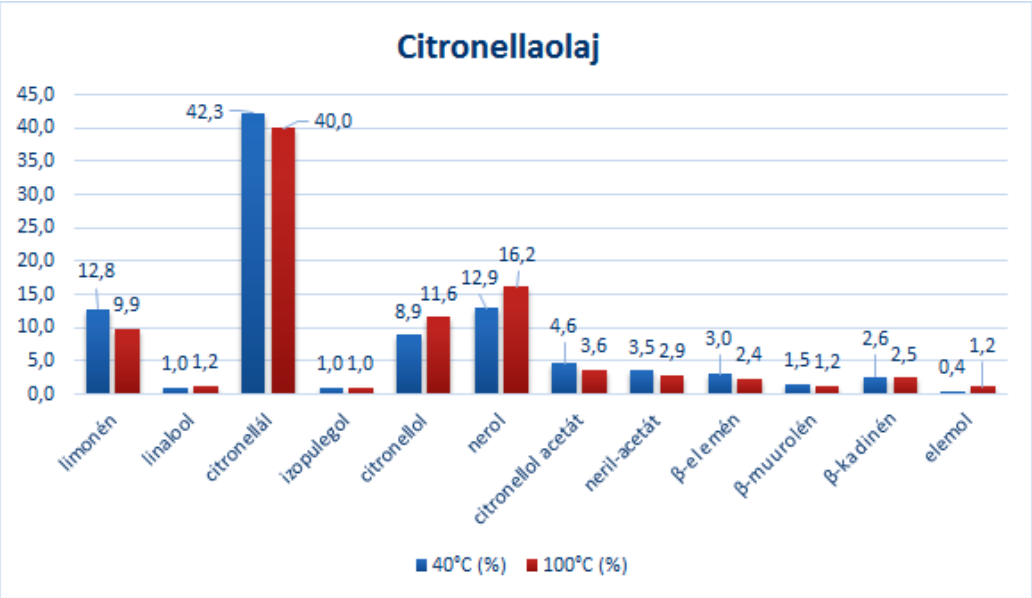
Fahéjolaj esetén 40°C-on és 100°C-on egyaránt az illóolaj fő komponense, a fahéjaldehid (45,9-52,1%) dominált a gőztérben. Ezenfelül 5% feletti mennyiségben, 40°C-os inkubálásnál, a légtérben *p*-cimol, *α*-pinén, 1,8-cineol, limonén, linalool és *β*-kariofillén volt kimutatható. Fahéj-acetátot, mint a minta GC-FID-del kimutatott másik fő komponensét, csak kis mennyiségben (1,9% és 3%) detektáltunk a gőztérben mindkét hőmérsékleten (6. ábra).



6. ábra A fahéjkéreg olaj sHS-SPME-GC-MS vizsgálatának eredménye 40°C-os és 100°C-os inkubációs hőmérsékleteknél

A citronellaolaj esetén a minta fő komponense (citronellál, 40,0-42,3%) mellett 10% feletti mennyiségben limonén és nerol volt kimutatható 40°C-on. Citronellol komponens hasonló arányban egyedül a 100°C-on történő inkubáción volt jellemző (7. ábra). A GC-

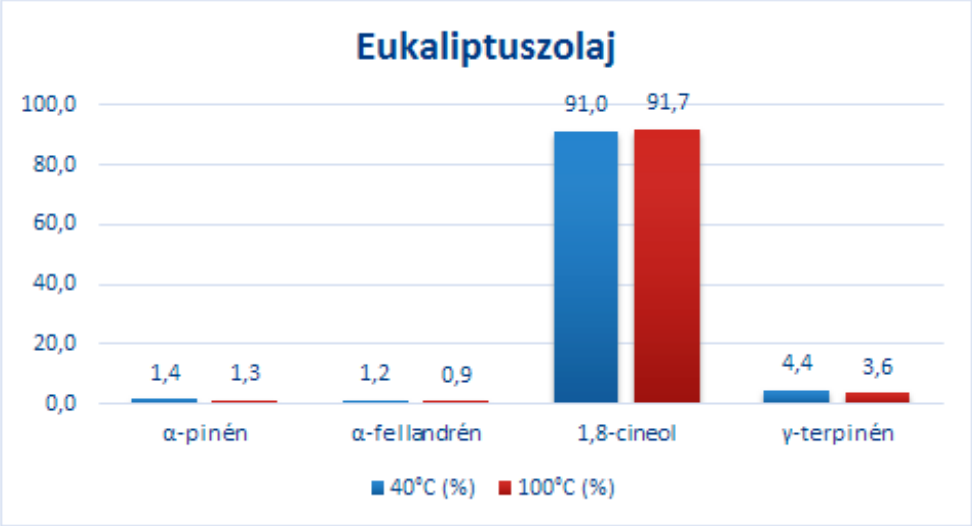
FID-del kimutatott geraniol komponens a gőztéranalízis során csak igen kis mennyiségben volt kimutatható (0,8% és 0,9%), így ez nem került feltüntetésre a diagramon. 1-3%-ban szeszkviterpén komponensek (*β*-elemén, *β*-muurolén, *β*-kadinén) is jelen voltak a gőztérben mindkét hőmérsékleten.



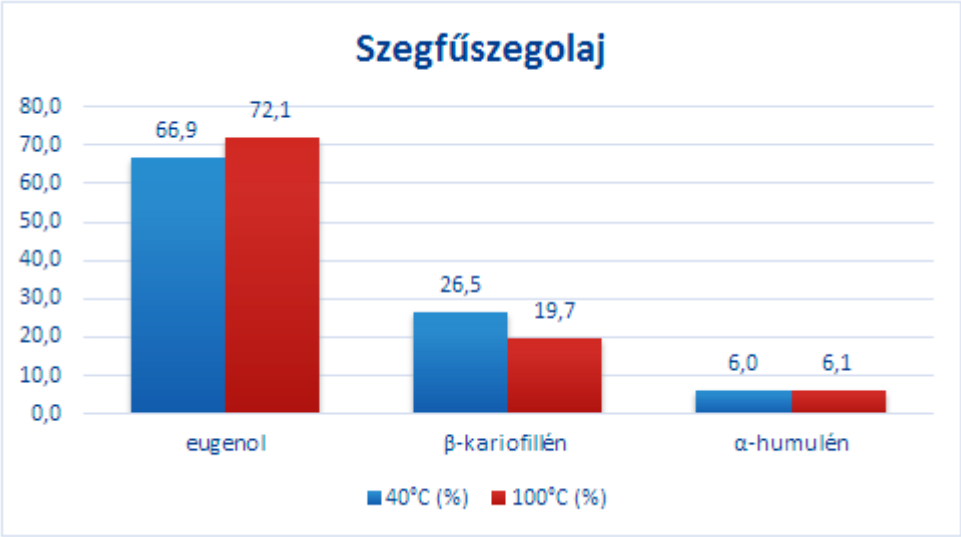
7. ábra A citronellaolaj sHS-SPME-GC-MS vizsgálatának eredménye 40°C-os és 100°C-os inkubációs hőmérsékleteknél

Az eukaliptuszolaj esetén 40°C-on és 100°C-on is az 1,8-cineol (91,0% és 91,7%) valamint kisebb százalékban (3,6% és 4,4%) a *γ*-terpinén dominált (8. ábra). A GC-FID analízis során kimutatott limonén, *p*-cimol, *α*- és *β*-pinén szintén 1% alatti jelenlétet mutatott a gőztérrel végzett vizsgálatok során.

A szegfűszeg illóolajában az analízis során, hasonlóan a GC-FID eredményeihez, úgy találtuk, hogy mindkét hőmérsékleten az eugenol, *β*-kariofillén és *α*-humulén volt jelen nagyobb mennyiségben (9. ábra). A komponensek aránya a két hőmérséklet esetén közel azonosnak tekinthető.



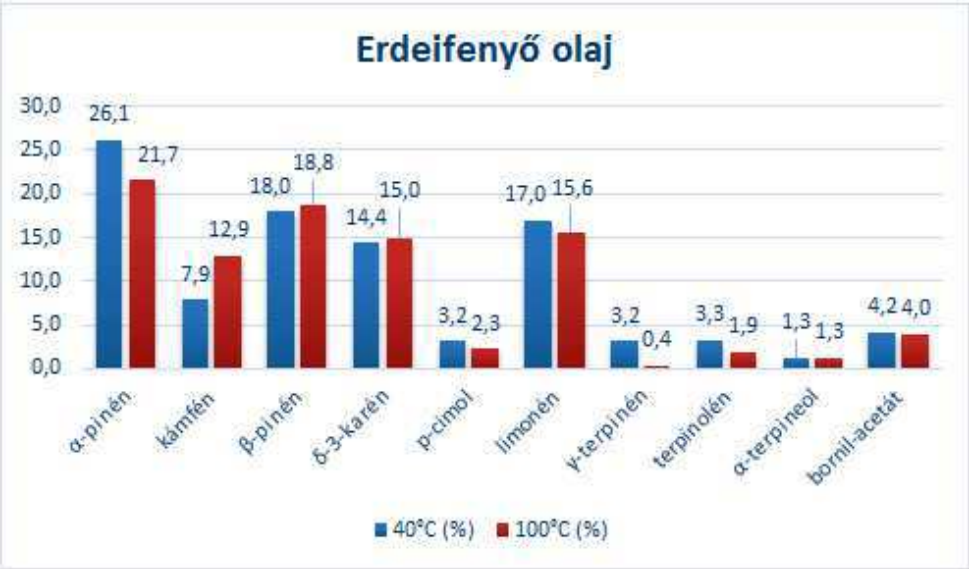
8. ábra Az eukaliptusz illóolaj sHS-SPME-GC-MS vizsgálatának eredménye 40°C-os és 100°C-os inkubációs hőmérsékleteknél



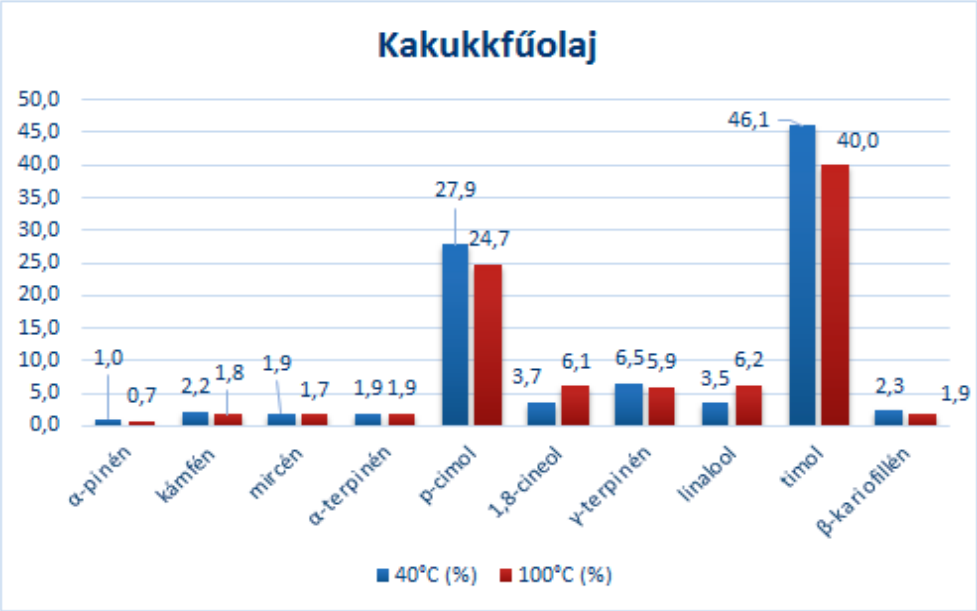
9. ábra A szegfűszeg illóolaj sHS-SPME-GC-MS vizsgálatának eredménye 40°C-os és 100°C-os inkubációs hőmérsékleteknél

Az erdeifenyő olajának 40°C-os gőzterében az *α*- és *β*-pinén mellett elsősorban limonén és *δ*-3-karén volt kimutatható 10% feletti mennyiségben. Az *α*-terpineol mindkét hőmérsékleten csupán 1,3%-ban, a *β*-kariofillén 0,1%-ban és 0,2%-ban volt azonosítható a gőztérben (10. ábra).

A kakukkfűolaj vizsgálatánál a timolon kívül a *p*-cimol jelenléte határozta meg a gőztér összetételét (11. ábra). Emellett kiemelendő az 1,8-cineol, linalool és *γ*-terpinén 3%-ban, illetve 6%-ban való jelenléte is.

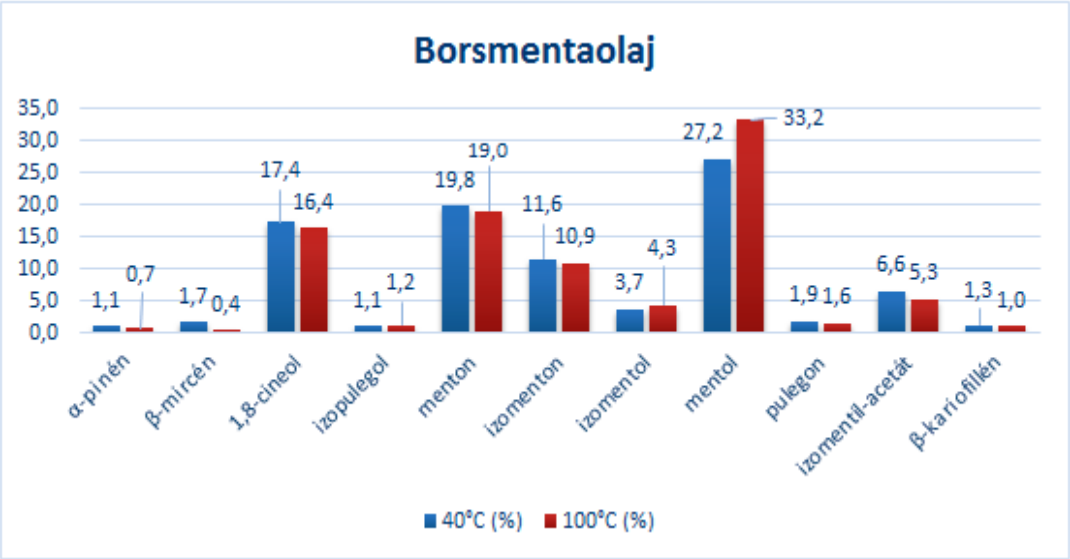


10. ábra Az erdeifenyő olaj sHS-SPME-GC-MS vizsgálatának eredménye 40°C-os és 100°C-os inkubációs hőmérsékleteknél



11. ábra A kakukkfű illóolaj sHS-SPME-GC-MS vizsgálatának eredménye 40°C-os és 100°C-os inkubációs hőmérsékleteknél

Borsmentaolaj esetén a mentol (27,2% és 33,2%) és származékai mellett az 1,8-cineolt azonosítottuk jelentős mennyiségben (16,4% és 17,4%) (12. ábra).



12. ábra: A borsmenta illóolaj sHS-SPME-GC-MS vizsgálatának eredménye 40°C és 100°C-on

Összefoglalásként elmondható, hogy a sHS-SPME-GC-MS analízis során a GC-FID vizsgálattal egybevágó eredményeket észleltünk az illóolajok fő komponenseinek előfordulása tekintetében. Ennek ellenére meg kell jegyeznünk, hogy számos esetben a lángionizációs detektálás (FID) során nagyobb százalékban azonosított komponensek nem fordultak elő 1% feletti mennyiségben a vizsgált illóolajok gőztereiben, illetve kisebb eltérések mutatkoztak a 40°C-on és 100°C-on történt inkubáció során kialakult gőzterek összetételét illetően. A különbségek abból adódhatnak, hogy különböző hőmérsékleten az egyes illóolaj-komponensek eltérő illékonyságúak és forráspontúak.

5.3 Tesztbaktériumok antibiotikum érzékenységének értékelése

A korongdiffúziós vizsgálatok során az inkubációs idő elteltével látható fényben értékeltük a gátlási zónák létrejöttét, eredményeinket a 7. és 8. táblázatban foglaltuk össze. A cél az volt, hogy az antimikrobás tesztek során megfelelő antibiotikum kerüljön kiválasztásra, amellyel összehasonlíthatjuk illóolajaink aktivitását. A vizsgálatok segítségével ezen felül meghatároztuk a betegből izolált törzsek klasszikus szerekkel szembeni rezisztenciáját is.

Egy genuson belül törekedtünk arra, hogy olyan antibiotikumot válsszunk ki, amelyre mindegyik faj érzékeny, könnyen beszerezhető, költséghatékony, valamint jó oldékonyságú és nem zavarja a mérési eredményeket. Ennek megfelelően MRSA esetén a vankomicint és gentamicint, *Haemophilus* törzsek esetén az amikacint, *Streptococcusok* és *M. catarrhalis*

ellen az imipenemet választottuk ki. A *Pseudomonas* törzsek rezisztencia-mintázatát a 8. táblázat foglalja össze, amely alapján a Polimixin B, ciprofloxacin és gentamicin mellett döntöttünk.

7. táblázat: Tesztbaktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálata korongdiffúzióval

Antibiotikum	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Amikacin	-	**R**	S	S	S	S	S
Amoxicillin/ klavulánsav	-	S	S	S	**R**	**R**	S
Ciprofloxacin	**R**	S	S	S	S	S	S
Ceftazidim	-	S	S	-	-	-	-
Eritromicin	-	-	-	-	S	S	-
Gentamicin	S	**R**	S	S	S	S	S
Imipenem	-	S	S	S	S	S	S
Oxacillin	**R**	-	-	-	-	-	-
Penicillin	**R**	-	-	-	-	-	-
Piperacillin/ tazobaktám	-	S	S	-	-	-	-
Vankomicin	S	-	-	-	-	-	-

R: rezisztens, S: érzékeny. 1: MRSA, 2: *S. pyogenes,* 3: *S. pneumoniae,* 4: *S. mutans,* 5: *H. influenzae,* 6: *H. parainfluenzae,* 7: *M. catarrhalis.*

8. táblázat: *Pseudomonas* törzsek rezisztencia mintázata

Antibiotikum	***P. aeruginosa***	**R-** ***P. aeruginosa***
Amikacin	S	S
Ciprofloxacin	S	**R**
Ceftazidim	S	S
Cefepim	S	S
Gentamicin	S	S
Imipenem	S	**R**
Kolisztin	S	S
Levofloxacin	S	**R**
Piperacillin/tazobaktám	S	S
Trimetoprim/szulfametoxazol	**R**	**R**
Tobramicin	S	S

R: rezisztens, S: érzékeny.

5.4 Az illóolajok antibakteriális hatásának értékelése

5.4.1 Direkt bioautográfiás vizsgálatok

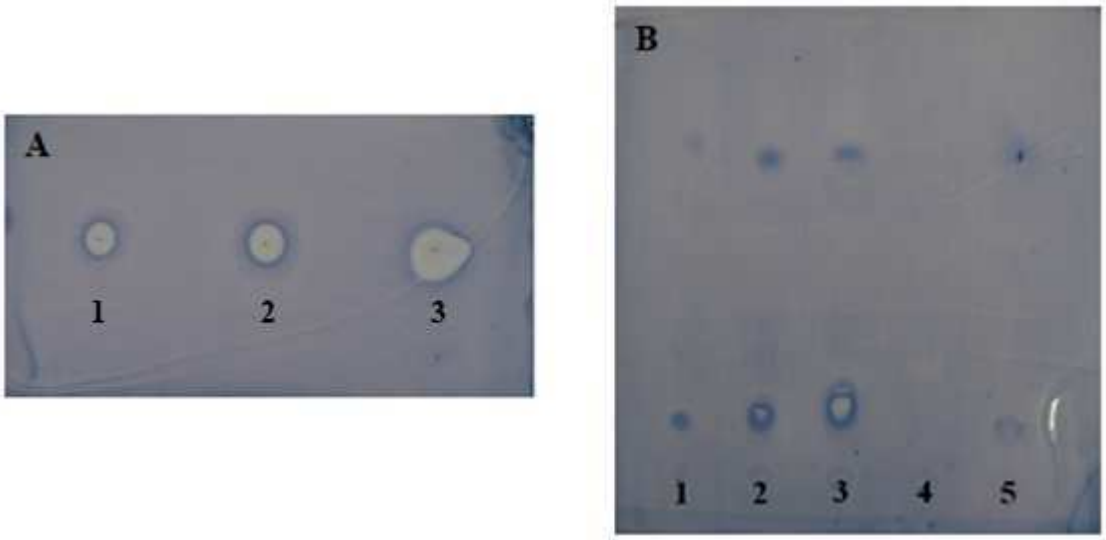
Az A. adamsii illóolajának bioautográfiás vizsgálata:

Az illóolajjal végzett mikrobiológiai kísérletek a 4.3.3.1 fejezetben leírtak szerint történtek két elrendezés szerint („A” és „B” módszer). Tekintettel arra, hogy a nemzetség számos tagját (*A. afra, A. herba-alba, A. mongolica*), a népi gyógyászat eredményesen alkalmazza légúti kórképek kezelésére, illetve jelentős antimikrobás hatással is rendelkeznek ezen kórképeket okozó baktériumokkal szemben (Wright 2002, Suliman et al. 2010), az általunk desztillált *A. adamsii* illóolaját is terveztük légúti patogénekkel szemben megvizsgálni. A gázkromatográfiás vizsgálatok eredményeit figyelembe véve azonban valószínűsítjük, hogy az illóolaj magas *α*-tujon-tartalma valószínűleg nem tenné lehetővé annak jelentős mellékhatások nélküli inhalációs alkalmazását, azonban mindenképpen érdemesnek tartottuk a gyógynövény antibakteriális hatását feltérképezni MRSA esetén, amely kórházi környezetben gyakran előfordul. Megemlítendő, hogy az *α*-tujon már kis mennyiségben (200-400 mg) is neurotoxikus, irritáló és görcskeltő hatású (Tisserand és Young 2014). Bár a fent említett *Artemisia* fajok illóolaja szintén tartalmaz tujon komponenst, ennek mennyisége a növény élőhelyétől függően igen nagy változatosságot mutat, illetve lényegesen kisebb százalékban fordul elő az esetek többségben, mint az *A. adamsii* illóolajában (Viljoen et al. 2006, Mohamed et al. 2010).

Direkt bioautográfiás vizsgálataink során megfigyeltük, hogy az összillóolaj abszolút etanollal készült hígítása gátló hatást mutatott MRSA esetén (13. ábra, A réteg). Az 1. és 2. pontban felvitt 3 és 5 µl törzsoldat (0,558 mg és 0,903 mg hígítatlan illóolaj) által kialakított gátlási zónák átmérője 4,5 mm illetve 5,5 mm volt. A rétegre 3. pontként felvitt 0,004 mg vankomicin esetén 7 mm-es gátlási zónát detektáltunk. Ebből következik, hogy illóolajunkból nagyobb mennyiségre lenne szükség az antibiotikumhoz megközelítőleg azonos hatás elérése érdekében.

A „B” módszer szerint vizsgálva az illóolaj egymástól vékonyréteg-kromatográfiás eljárással elkülönített összetevőinek aktivitását azt tapasztaltuk, hogy gátlási zónát a 0,15-0,45 közötti retenciós értékkel rendelkező terpén-alkohol komponensek képeztek. Ebből következően nem az illóolaj fő komponense (*α*-tujon) és a GC vizsgálat szerint 15,2%-ban jelen lévő 1,8-cineol tehetők felelőssé az antibakteriális hatás kiváltásáért. Feltételezésünket igazolta, hogy a 4. és 5. pontban felvitt tujon illetve 1,8-cineol standard esetén fehér gátlási zóna nem volt észlelhető. Ennek megfelelően valószínűsítjük, hogy MRSA esetén az antibakteriális hatás főként az illóolaj minor vegyületeihez köthető. Megfigyelésünk hasonló Viljoen és munkatársainak (2006) észrevételéhez, amely szerint az *A. afra* illóolaja antibakteriális hatást mutatott légúti baktériumok (*Klebsiella pneumoniae*, *Cryptococcus*

neoformans) ellen, de annak fő komponensei (*α*- és *β*-tujon, valamint 1,8-cineol) önmagukban illetve kombinációkban nem eredményeztek jelentősebb aktivitást.



13. ábra Az *A. adamsii* illóolajának direkt bioautográfiás vizsgálata elválasztás nélkül („A" módszer) és kifejlesztéssel („B" módszer)

A: 1: 0.558 mg illóolaj**, 2:** 0.903 mg illóolaj, **3:** 0.004 mg vankomicin; **B: 1-2-3:** 1-3-5 µl alkoholos illóolaj törzsoldat, **4:** 1,8-cineol standard (2 µl), **5:** tujon standard (2 µl)

Összefoglalva elmondható, hogy az *A. adamsii* illóolaja bár hatásosnak bizonyult MRSA ellen, az antibakteriális hatásért felelős vegyületek valószínűleg az illóolajban kisebb mennyiségben jelenlévő összetevők között keresendők. Antibiotikum hatásával összevetve az illóolaj ugyan kevésbé mutatkozott aktívnak, azonban felületi fertőtlenítőként eredményesen alkalmazható szer lehet. Ennek igazolására, valamint a hatásos koncentráció meghatározására azonban további kutatások szükségesek. Ezen felül az illóolaj biztonságos alkalmazása szempontjából, tekintettel a fő komponens által kiváltható lehetséges mellékhatásokra, további citotoxicitási tesztek elvégzésére is szükség lenne a jövőben, amelyre jelenleg nem volt lehetőségünk.

Az Aromax illóolajok bioautográfiás vizsgálata:

A kereskedelmi forgalomban kapható illóolajaink bioautográfiás vizsgálata főként az el nem választott illóolajok (összillóolaj) antibakteriális vizsgálatára irányultak. Megjegyezzük, hogy bár a direkt bioautográfia módszere a klasszikus mikrobiológiai vizsgálómódszerekhez

képest (pl. korong diffúziós) sokkal informatívabb, gyorsabb és hatékonyabb detektálást tesz lehetővé, a speciális táptalajt (véres, illetve csokoládé agart) igénylő törzseink esetén ez idáig nem sikerült megfelelő mértékben optimalizálnunk a tesztrendszert. Ennek megfelelően illóolajaink aktivitását MRSA, R-*P. aeruginosa* és kevésbé rezisztens *P. aeruginosa* esetén vizsgáltuk meg. A módszer alkalmazása során meghatároztuk az illóolajok hatása által létrehozott gátlási zónák átmérőit, amelyeket az 9. táblázatban tüntettünk fel.

MRSA esetén a szegfűszeg illóolaja eredményezte a legnagyobb gátlást (9,5 mm), amelyet aktivitásban az eukaliptusz, a kakukkfű és fahéj illóolaja követett. Borsmenta és citronella illóolaj esetén kisebb antibakteriális hatás (4,4-4,8 mm) csak a magasabb koncentrációk alkalmazása esetén volt megfigyelhető. Ezzel szemben az erdeifenyő illóolaja még magasabb koncentráció esetén sem mutatott gátlást a baktériummal szemben. Eredményeinkhez hasonlóan Horváth és munkatársai (2011) a fahéjkéreg, kakukkfű, eukaliptusz, szegfűszeg hatásosságáról számoltak be több, klinikai betegből izolált meticillin-rezisztens és meticillin-szenzitív *S. aureus* ellen is.

R-*P. aeruginosa*-val végezve vizsgálatokat a fahéj illóolaját találtuk a legjobbnak, a kakukkfű és szegfűszeg olaja esetén egyenértékű hatást (6,3 mm) figyeltünk meg. A többi illóolaj esetén eredményes gátlás nem volt kimutatható a baktériummal szemben. A kevésbé rezisztens *P. aeruginosa* törzset vizsgálva az előző esetben leírtakhoz hasonlóan a fahéj illóolaja volt a legerősebb antibakteriális hatású (9,3 mm). A szegfűszeg és kakukkfű olaja ugyancsak jelentős gátlást mutatott (7,3-8,0 mm). Az erdeifenyő olaja esetén egyedül a *P. aeruginosa*-val szemben detektáltunk nagyon alacsony aktivitást (3,8 mm). Ez esetben a borsmenta és citronella illóolaja hasonló aktivitást mutatott, az eukaliptusz illóolaj azonban nem eredményezett gátlást még a magasabb koncentrációkban sem. Fontos megemlíteni, hogy a vizsgálatok során oldószer-kontrollként alkalmazott abszolút etanol egyetlen esetben sem mutatott aktivitást a baktériumokkal szemben, így igazolható, hogy mintáink antibakteriális hatásáért az illóolajok komponensei tehetők felelőssé.

Pozitív kontrollként antibiotikumokat használtunk, MRSA esetén vankomicint, *Pseudomonas* törzseknél ciprofloxacint és polimixin B-t. MRSA vizsgálatakor 0,25 µg vankomicint használva 3,8 mm, 0,5 µg ciprofloxacint alkalmazva *P. aeruginosa*-nál 7 mm átmérőjű gátlást detektáltunk. A ciprofloxacin várakozásainknak megfelelően nem volt aktív R-*P. aeruginosa* ellen. Polimixin B tekintetében megfigyeltük, hogy tesztrendszerünkben az antibiotikum csupán 2 mm-es gátlást eredményezett. Ez esetben a gátlási zóna mérete nem változott a koncentráció emelésével, így feltételezzük, hogy valamilyen külső körülmény

miatt az elégtelen diffúziónak köszönhetően nem tudta kifejteni kellő hatását az antibiotikum.

Összegezve elmondható, hogy a direkt bioautográfia módszere az antibakteriális hatás gyors és hatékony kimutatását teszi lehetővé, ezen felül segítségével ugyanazon tesztrendszerben egyszerre vizsgálható több illóolaj-koncentráció, valamint antibiotikumok aktivitása is a kísérleti körülmények megváltoztatása nélkül. Optimalizálása különleges táptalajt igénylő törzsek (pl. *Streptococcusok* és *Haemophilusok*) esetén azonban a jövő feladata.

9. táblázat A kereskedelmi forgalomban kapható illóolajok direkt bioautográfiás vizsgálatában meghatározott gátlási zónák átmérője mm-ben kifejezve

Illóolajok	**Gátlási zónák átmérői (mm)**		
	MRSA	**R-*P. aeruginosa***	***P. aeruginosa***
Fahéjkéreg	3,0-4,3-5,3-6,3	3,5-4,3-7,3-**8,0**	4,0-5,5-6,8-**9,3**
Szegfűszeg	3,8-6,5-8,0-**9,5**	3,8-4,8-5,8-6,3	5,2-6,0-6,9-7,3
Kakukkfű	5,0-5,8-6,8-7,5	4,3-5,3-5,8-6,3	5,3-6,0-7,3-8,0
Erdeifenyő	n.a.	n.a.	3,5-3,5-3,8-3,8
Eukaliptusz	4,0-5,2-7,0-7,0	n.a.	n.a.
Borsmenta	0-0-3,6-4,4	n.a.	3,8-3,8-4,5-4,5
Citronella	0,0-3,3-4,0-4,8	n.a.	4,0-4,5-5,3-5,5

n.a.=nincs aktivitás. A táblázatban minden esetben a hígítatlan illóolaj (0,025-0,05-0,1-0,15 mg) által létrehozott gátlási zóna átmérőjét tüntettük fel. Félkövérrel kiemelve a legnagyobb gátlási zóna.

Illóolajaink tekintetében kiemelendő, hogy mindegyik aktívnak bizonyult legalább egy általunk vizsgált törzzsel szemben, azonban aktivitásuk jelentős különbséget mutatott. MRSA esetén a szegfűszeg illóolaja, míg *Pseudomonas* törzsek esetén a fahéj illóolaja bizonyult a legaktívabbnak. Mintáink sajnálatos módon alacsonyabb hatékonyságúnak bizonyultak a vizsgált referencia antibiotikumokhoz képest, azonban aktivitásuk hasonlóképpen a terápiában alkalmazott szerekhez, koncentrációtól való függést mutatott.

5.4.2 A csőhígítás módszerének eredményei

A módszer során szintén a teljes illóolaj antimikrobás aktivitását értékeltük, meghatározva az adott mikroorganizmussal szemben mutatott MIC, illetve MBC értékeket. Kísérleti eredményeinket a 10.-13. táblázatok foglalják össze. Minimális gátló koncentrációként határoztuk meg az illóolaj azon legkisebb koncentrációját, amely az inkubációs idő letelte után (48 óra), a kontrollhoz viszonyítva jelentős mértékben képes volt a baktérium szaporodását gátolni. Minimális baktericid koncentrációként az illóolaj azon legkisebb koncentrációját adtuk meg, amely esetén szilárd táptalajra oltva a csövek tartalmát, nem volt megfigyelhető az adott baktérium növekedése (Lóránd et al. 2002, Patel et al. 2011). Az antibakteriális szerek minimális gátló koncentrációit a különböző törzsek esetében a 13. táblázatban foglaltuk össze.

A vizsgálatok során *S. pyogenes*-szel szemben leghatásosabbnak a szegfűszeg illóolaja mutatkozott (MIC: 0,1 mg/ml), amelyet aktivitásban a citronella és borsmenta illóolaja követett (MIC: 0,17 mg/ml és 0,35 mg/ml). A baktérium esetén közel azonos aktivitásúnak találtuk a fahéjkéreg és kakukkfű olaját.

10. táblázat Az Aromax illóolajok antibakteriális hatásának értékelése csőhígítás módszerével Gram-pozitív baktériumokkal szemben

Illóolaj	***S. pyogenes***		***S. pneumoniae***		***S. mutans***	
	MIC	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**
Fahéj	0.41	0.81	**0.06**	0.13	0.20	0.41
Kakukkfű	0.43	0.87	0.11	0.22	**0.04**	0.09
Szegfűszeg	**0.10**	0.20	0.25	0.50	0.41	0.81
Borsmenta	0.35	0.70	0.35	0.70	0.70	1.39
Citronella	0.17	0.34	0.09	0.17	0.17	0.34
Eukaliptusz	2.82	5.64	1.41	2.81	0.70	1.41
Erdeifenyő	1.35	2.71	0.68	1.35	1.35	2.71

A MIC és MBC értékek mg/ml-ben kifejezve. Félkövérrel kiemelve a leghatásosabb illóolaj-koncentráció.

Az eukaliptusz és erdeifenyő illóolaja csupán nagyobb mennyiségben bizonyult aktívnak *S. pyogenes* ellen. A *S. pneumoniae* esetén a citronella és fahéjkéreg olaja tudott kisebb koncentrációban gátló hatást kifejteni (MIC: 0,06-0,09 mg/ml). Emellett jelentős aktivitás volt kimutatható már alacsony koncentráció esetén a kakukkfű-, a szegfűszeg- és a borsmentaolajnál (MIC: 0,11-0,35 mg/ml) is. Az eukaliptusz olaját tekintve a fahéjkéregolajhoz képest több mint húszszoros mennyiségre volt szükségünk az eredményes gátlás eléréséhez.

A kakukkfű illóolaját a *Streptococcus*-ok közül a *S. mutans*-szal szemben értékeltük a legaktívabbnak. Az igen ellenálló mikroorganizmus esetén a fahéjkéreg, a citronella, a szegfűszeg is eredményesnek bizonyult (MIC: 0,17-0,41 mg/ml). Erdeifenyő esetén ez esetben is csak magasabb koncentrációban tapasztaltunk antibakteriális hatást. *Haemophilus* törzseken végzett vizsgálatainkban mindkét esetben a fahéjkéreg illóolaja volt a leginkább hatékonynak mondható (MIC: 0,06 mg/ml) mintáink közül. Kiemelendő, hogy mind a *H. influenzae* mind a *H. parainfluenzae* törzsek esetén a kakukkfű, a szegfűszeg és a borsmenta illóolaja antimikrobás aktivitásban nem mutatott különbséget (11. táblázat). Ezzel szemben a citronella és eukaliptusz illóolajok *H. parainfluenzae* ellen hatékonyabbnak bizonyultak. Az erdeifenyő illóolaja Gram-negatív baktériumaink közül egyedül a *H. parainfluenzae*-vel és *M. catarrhalis*-szal szemben mutatott jelentősebb aktivitást (MIC: 0,34 mg/ml).

11. táblázat Az Aromax illóolajok antibakteriális hatásának értékelése csőhígítás módszerével Gram-negatív baktériumokkal szemben

Illóolaj	***P. aeruginosa***		***H.influenzae***		***H.parainfluenzae***		***M. catarrhalis***	
	MIC	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**
Fahéj	**0,40**	0,80	**0.06**	0.13	**0.06**	0.13	0.10	0.20
Kakukkfű	1,40	2,80	0.11	0.22	0.11	0.22	**0.09**	0.18
Szegfűszeg	1,60	3,30	0.25	0.50	0.25	0.50	0.25	0.50
Borsmenta	>44,5	>44,5	0.21	0.43	0.21	0.43	0.35	0.70
Citronella	>43,9	>43,9	0.21	0.42	0.11	0.21	0.11	0.21
Eukaliptusz	2,80	5,60	1.41	2.81	0.70	1.41	2.81	5.64
Erdeifenyő	>43,4	>43,4	1.35	2.70	0.34	0.68	0.34	0.68

A MIC és MBC értékek mg/ml-ben kifejezve. Félkövérrel kiemelve a leghatásosabb illóolaj-koncentráció.

P. aeruginosa esetén magasabb illóolaj-koncentrációt alkalmazva a kakukkfű, a szegfűszeg és az eukaliptusz esetén szintén eredményes antibakteriális hatást detektáltunk. A borsmenta, a citronella és erdeifenyő illóolaja még nagyobb mennyiségben is csak bakteriosztatikus hatást fejtett ki erre a baktériumra.

MRSA-val szemben a borsmenta és erdeifenyő olajának kivételével minden illóolaj aktívnak mutatkozott, amelyek közül legalacsonyabb MIC értékével (0,1 mg/ml) a szegfűszeg emelkedett ki (12. táblázat).

R-*P. aeruginosa* esetén, bioautográfiás eredményeinkkel egybevágóan, a fahéjkéreg illóolaját találtuk leghatékonyabbnak, a többi illóolaj csupán bakteriosztatikus hatással rendelkezett. A csőhígítás során negatív kontrollként alkalmazott szolubilizálószert, valamint illóolajjal nem kezelt táptalajt tartalmazó cső esetén sem tapasztaltunk gátló hatást

az adott baktérium növekedésére, így megállapítható, hogy az antibakteriális hatásért elsősorban illóolajaink és komponenseik tehetők felelőssé.

12. táblázat A kereskedelmi forgalomban kapható illóolajok antibakteriális hatásának értékelése csőhígítás módszerével rezisztens baktériumtörzsek ellen

Illóolaj	MRSA		R-*P. aeruginosa*	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Fahéjkéreg	0,40	0,80	**0,40**	0,80
Kakukkfű	0,40	0,70	>45,3	>45,3
Szegfűszeg	**0,10**	0,20	>51,9	>51,9
Borsmenta	>44,5	>44,5	>44,5	>44,5
Citronella	1,4	2,8	>43,9	>43,9
Eukaliptusz	5,6	11,3	>45,1	>45,1
Erdeifenyő	>43,4	>43,4	>43,4	>43,4

MIC és MBC értékek mg/ml-ben kifejezve. Félkövérrel kiemelve a leghatásosabb illóolaj-koncentráció.

Eredményeinkkel összhangban Pereira és munkatársai (2014) az eukaliptusz olajának hatásosságát hangsúlyozták antibiotikumra rezisztens és érzékeny *P. aeruginosa* törzsekkel szemben. Ezen felül kiemelték, hogy az illóolaj gentamicinnel kombinálva a rezisztens törzsek esetén szinergista hatással rendelkezett, antibiotikumra érzékeny törzsek esetén pedig additívnak bizonyult. Tyagi és Malik (2011a), valamint Hendry és munkacsoportja (2009) által publikált kísérletek szintén az eukaliptusz olajának gátló hatását igazolták csőhígításos módszert alkalmazva, azonban a MIC értékek meghaladják az általunk meghatározott gátló koncentrációkat. Ellentétben az általunk tapasztalt bakteriosztatikus hatással, a már említett kutatók (Tyagi és Malik 2011b) a borsmenta olajának gátló hatását is detektálták (MIC: 2,25 mg/ml) *P. aeruginosa*-val szemben. Egybehangzóan eredményeinkkel Ghabraie és kutatócsoportja (2016) a fahéj olaját találta a legaktívabbnak *P. aeruginosa*-val szemben, azonban kakukkfű és szegfűszeg esetén nem sikerült gátló hatást detektálniuk, amely ellentétben áll az általunk tapasztaltakkal. Erdeifenyő esetén megfigyeléseik az illóolaj inaktivitásáról szintén hasonlóak voltak saját méréseinkhez. Eredményeink pontos összevetését az említett tanulmányokkal nagyban korlátozza az a tény, hogy a legtöbb esetben a szerzők nem publikálták az alkalmazott illóolaj összetételét.

Az általunk alkalmazott eukaliptusz olaj összetételéhez hasonló olajat alkalmazva, Mulyaningsih és munkatársai (2011) számos klinikai betegből izolált MRSA esetén értek el eredményes gátlást. A szerzők által meghatározott minimális gátló koncentrációk MRSA-t tekintve hasonlóak, *P. aeruginosa* tekintetében magasabbak az általunk meghatározott

értékekkel összevetve. Ezen felül illóolaj-komponensekkel végzett kutatásaikban kimutatták, hogy MRSA ellen főként más eukaliptusz fajok illóolajában nagyobb mennyiségben jelenlévő citronellal és citronellol hatékonyabb gátlást tud kiváltani, mint az *E. globulus* olajának 1,8-cineol összetevője. Choi és munkatársainak (2016) *S. mutans*-szal végzett vizsgálatai szintén megerősítik a fahéj jelentős antibakteriális hatását, ezen felül megvizsgálva komponenseinek aktivitását megállapították, hogy a legeredményesebb gátlást a fahéjaldehid képes kiváltani (MIC: 0,02 v/v%). Ezen felül a munkacsoport korong diffúzióval az eukaliptusz és erdeifenyő olaját kevésbé, a borsmentáét mérsékelten, a szegfűszeg olaját pedig jelentősen aktívnak találta a baktériummal szemben, amely megfigyelések összhangban vannak az általunk tapasztalatakkal (Choi et al 2016). Bár kísérleteinkben a *S. mutans*-sal szemben az eukaliptusz olaja csupán nagyobb koncentrációban mutatott aktivitást, korábbi tanulmányok eredményes gátlást igazoltak az illóolaj kis mennyiségének alkalmazása esetén is (Goldbeck et al. 2014). Ez az eltérés véleményünk szerint elsősorban az alkalmazott módszer körülményeiből, valamint az illóolajok mennyiségi összetételének eltéréséből adódik.

H. influenzae, *M. catarrhalis* és *S. pyogenes* esetén a kakukkfű olaját vizsgálva Tanaka és munkatársainak (2002) eredményeihez viszonyítva alacsonyabb MIC értéket eredményezett az általunk vizsgált illóolaj. Szegfűszeg tekintetében *S. pyogenes* és *M. catarrhalis* esetében szintén alacsonyabb gátló koncentrációt detektáltunk, míg eukaliptusz és borsmentaolaj esetén eredményeink közel azonosak voltak. Ezenfelül a kutatócsoport számos illóolaj-komponens (fahéjaldehid, *p*-cimén, *β*-kariofillén, bornil-acetát, 1,8-cineol, *α*-humulén, eugenol, mentol, timol, *α*-pinén) eredményes antimikrobás hatásáról is említést tett (Tanaka et al 2002).

13. táblázat Antibiotikumok hatásának értékelése csőhígítás módszerével

Antibiotikum	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
	MIC	**MIC**	**MIC**	**MIC**	**MIC**	**MIC_{90}**	**MIC**	**MIC**	**MIC_{90}**
Gentamicin	12,5	>100	6,3	-	-	-	-	-	-
Vankomicin	>100	-	-	-	-	-	-	-	-
Polimixin B	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicillin/ klavulánsav	-	-	-	-	-	0,8	-	-	0,2
Imipenem	-	-	-	25,0	0,8	3,1	-	-	0,2
Amikacin	-	-	-	-	-	-	3,1	1,6	-

MIC értékek µg/ml-ben kifejezve. **1:** MRSA; **2:** R-*P. aeruginosa*; **3:** *P. aeruginosa*; **4:** *S. pyogenes*; **5:** *S. pneumoniae*; **6:** *S. mutans*; **7:** *H. influenzae*; **8:** *H. parainfluenzae*; **9:** *M. catarrhalis*

A *Cymbopogon nardus* illóolajának *M. catarrhalis* esetén kifejtett eredményes gátló hatása egybecseng korábbi vizsgálatok tapasztalataival, kiemeledő azonban, hogy az általunk meghatározott MIC érték alacsonyabb volt, amely vélhetően az illóolaj-komponensek mennyiségi eltérésének köszönhető (Ahmad és Viljoen 2015). Eukaliptuszolaj alkalmazása során kapott eredményeinkkel Cermelli és kutatócsoportjának (2008) megfigyelései *S. pyogenes* és *H. influenzae* esetén közel azonosnak bizonyultak, míg *H. parainfluenzae* és *S. pneumoniae* esetén az általunk meghatározott MIC értékek alacsonyabbak voltak. Fabio és kutatócsoportja (2007) eredményeinkkel összhangban hasonló gátlási sorrendet (fahéj>kakukkfű>szegfűszeg) figyelt meg *H. influenzae* és *S. pneumoniae* esetén.

Referencia antibiotikumokkal összehasonlítva csőhígításos eredményeinket elmondható, hogy mintáinkból az azonos hatás eléréséhez sokkal nagyobb mennyiségre lenne szükség, ennek megfelelően nem bizonyultak hatékonyabbnak a klasszikus terápiás szerekhez képest. Eredményességük azonban semmiképpen sem hanyagolható el, főként a rezisztenciával rendelkező mikroorganizmusok esetén, tekintettel arra, hogy velük szemben komplex összetételüknek és feltételezhetően több támadáspontú hatásmechanizmusuknak köszönhetően nehezebben alakul ki rezisztencia (Kon és Rai 2012).

Érdekes jelenség továbbá, hogy a bioautográfiás módszerben vizsgálva a borsmenta olaja hatékonyabbnak bizonyult, mint a csőhígításos technikát alkalmazva, ezzel szemben az eukaliptuszolaj főként ez utóbbi tesztrendszerben mutatkozott aktívabbnak. Az eredmények különbségei valószínűleg a két módszer eltérő körülményeiből származtathatók. A fentiek figyelembe vételével azonban mindenképpen indokolt egy adott illóolaj antimikrobás hatásának értékelése több tesztrendszer alkalmazásával is. Érdemes volna a jövőben az illóolajok antibiotikumokkal való együttes hatását is vizsgálni, mivel korábbi irodalmak szerint egyes esetekben képesek csökkenteni a kezelésként alkalmazott szer dózisát, illetve megnövelhetik azok hatékonyságát is (Mahboubi és Bidgoli 2010, Kon és Rai 2013, Pereira 2014).

5.4.3 A vapor phase technika eredményei

A gőzteres vizsgálatok során az előbb bemutatott módszerekkel ellentétben, az illóolaj folyékony állapotban közvetlenül nem került kapcsolatba a vizsgált mikroorganizmussal, annak növekedését egyedül az illékony komponensek által kialakított gőztér befolyásolta. Mintáinkat abszolút etanollal hígítottuk az illóolaj minél egyenletesebb szűrőpapíron való

eloszlatásának érdekében, amelynek megfelelően negatív kontrollként megvizsgáltuk az abszolút etanollal impregnált és kezeletlen szűrőpapír mikrobákra kifejtett aktivitását is (7. melléklet). Kísérleteink során megállapítottuk, hogy sem az alkalmazott szűrőpapír, sem az oldószer nem befolyásolta a baktériumok szaporodását. A 48 órás inkubációs periódust követően az Aromax illóolajok aktivitásának értékelésére meghatároztuk azt a legkisebb gátló koncentrációt (MIC: µl/l), amely szabad szemmel vizsgálva teljes mértékben képes volt meggátolni az adott baktérium növekedését. A MIC értékét az alkalmazott illóolaj mennyisége, valamint a csészében lévő szabad légtér térfogatának hányadosaként határoztuk meg. Kloucek és munkatársainak vizsgálataihoz hasonlóan (2012a,b) eredményeinket minden esetben egy literes légtérre vonatkoztatva adtuk meg. A gátló koncentrációk összefoglalása a 14.-15. táblázatban látható.

MRSA esetén a bioautográfiás és csőhígításos eredményeinkkel ellentétben a fahéjkéreg illóolaja által kialakított gőztér mutatkozott a legeredményesebbnek (MIC: 31,25 µl/l). Szintén jelentős hatást sikerült elérnünk a kakukkfű és szegfűszeg olaját magasabb koncentrációkban alkalmazva. MRSA ellen a borsmenta és citronella olaját azonos mértékben találtuk aktívnak (MIC: 375 µl/l), míg az eukaliptusz-, és az erdeifenyő olaj a legmagasabb koncentrációban sem eredményezett teljes gátlást.

14. táblázat Aromax illóolajok gőzterének antibakteriális hatása Gram-pozitív baktériumokkal szemben

Illóolaj	**MRSA**	***S. pyogenes***	***S. pneumoniae***	***S. mutans***
	MIC (µl/l)			
Fahéjkéreg	**31,25**	**75**	**75**	**90**
Kakukkfű	125	125	90	250
Szegfűszeg	225	225	150	500
Borsmenta	375	250	90	375
Citronella	375	125	50	250
Eukaliptusz	>1500	>1500	1200	>1500
Erdeifenyő	>1500	>1500	>1500	>1500

MIC értékek µl/l-ben kifejezve. Félkövérrel kiemelve a leghatásosabb illóolaj-koncentráció.

Multirezisztens *P. aeruginosa*-val szemben egyedül a fahéjkéregolaj magas koncentrációja mutatkozott hatékonynak (MIC:125 µl/l), amely megfigyelésünk egybecseng a csőhígítás során tapasztaltakkal. Ezzel szemben az antibiotikumokra érzékeny *P. aeruginosa* esetén a fahéjkéreg és a kakukkfű olajának aktivitása között nem tapasztaltunk különbséget (MIC: 31,25 µl/l). A bioautográfiás és csőhígításos tapasztalatokkal ellentétben

a szegfűszeg, eukaliptusz és borsmenta olaja nem mutatott jelentős antibakteriális hatást a baktériummal szemben.

15. táblázat Aromax illóolajok gőzterének antibakteriális hatása Gram-negatív baktériumokkal szemben

Illóolaj	*R-P. aeruginosa*	*P. aeruginosa*	*H. influenzae*	*H. parainfluenzae*	*M. catarrhalis*
			MIC (µl/l)		
Fahéjkéreg	**125**	**31,25**	**15,62**	**15,62**	**25**
Kakukkfű	>1000	**31,25**	25	31,25	50
Szegfűszeg	>1500	>1500	90	150	125
Borsmenta	>1500	>1500	50	75	31,25
Citronella	>1500	>1500	50	62,5	**25**
Eukaliptusz	>1500	>1500	125	200	225
Erdeifenyő	>1500	>1500	500	>1500	>1500

MIC értékek µl/l-ben kifejezve. Félkövérrel kiemelve a leghatásosabb illóolaj-koncentráció.

Eredményeinkkel egybevágóan Lopez és Goñi kutatócsoportjai (Lopez et al 2005, Goñi et al. 2009) sem észleltek szignifikáns aktivitást a szegfűszeg olajával kapcsolatban *P. aeruginosa*-nál. Kiemelendő, hogy a fahéj illóolajánál sem detektáltak látható gátlást, azonban ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a növény leveléből izolált illóolajjal dolgoztak, amely feltételezést a minták HS-SPME, valamint GC-ITMS (Gas chromatography – Ion Trap Mass Spectrometry) analízise is alátámaszt (Lopez et al 2005, Goñi et al. 2009). A borsmenta és eukaliptusz illóolaját módosított korongdiffúziós gőztér módszerben vizsgálva Tyagi és Malik (2011b) megfigyeléseinkkel ellentétben hatékony gátlásról számolt be *P. aeruginosa* esetén. Nedorostova és Kloucek kutatócsoportjai (2009, 2012a) vizsgálataikban sem a kakukkfű sem az eukaliptusz esetén nem számoltak be eredményes gátlásról, amely részben egybecseng az általunk meghatározottakkal. A kakukkfű illóolaja esetén tapasztalt eltérés valószínűsíthetően az illóolaj eltérő összetételével magyarázható.

Vizsgálataink során alkalmazott *Streptococcus* törzsek ellen a fahéjkéregolajat találtuk a legaktívabbnak, legmagasabb MIC értékeket a *S. mutans*-szal szemben detektáltunk, amely jól bizonyítja a baktérium erős ellenálló képességét. Szegfűszeg esetén csak nagyobb mennyiség (MIC: 150-500 µl/l) alkalmazásánál tapasztaltunk antimikrobás hatást *Streptococcusok* ellen. Az eukaliptusz olaját 1200 µl/l-es koncentrációban adva egyedül a *S. pneumoniae* növekedésének gátlása volt megfigyelhető. *H. influenzae*-vel végzett

vizsgálatainkban minden illóolaj hatékonynak bizonyult (MIC:15,62-500 µl/l). Kiemelendő, hogy az erdeifenyő illóolaja egyedül ezzel a mikroorganizmussal szemben mutatott jelentős aktivitást (MIC: 500 µl/l), amely tapasztalat részben egybevág a csőhígítás során megfigyeltekkel. *H. parainfluenzae* esetén az erdeifenyő kivételével szintén minden vizsgált olaj hatékony gátlást eredményezett, a MIC értékek azonban meghaladták a *H. influenzae* esetén tapasztaltakat.

Eredményeinkhez hasonlóan Inouye és munkatársai (2001a) is gátló hatásról számoltak be borsmenta-, valamint fahéjolaj tekintetében *H. influenzae*, *S, pyogenes* és *S. pneumoniae* ellen, az általuk meghatározott minimális gátló dózisok azonban alacsonyabbnak bizonyultak. Ezenfelül több vizsgálatban is kimutatták a fahéjaldehid, eugenol, timol, mentol, menton, terpinén-4-ol, 1,8-cineol eredményes gátló hatását is a már említett törzsekkel szemben (Inouye et al. 2001a,b, Houdkova et al. 2017). Érdekesség, hogy Houdkova és munaktársai (2017) a fahéjaldehid, eugenol és timol esetén mérsékelt aktivitásról számoltak be *H. influenzae* és *S. pneumoniae* kapcsán, illetve különbséget sem tapasztaltak a fahéjaldehid folyékony közegben és gőztérben vizsgált antibakteriális hatása között. Megjegyzendő azonban, hogy olyan kombinált rendszerrel végezték vizsgálataikat, amely a gőzteres és folyékony közegű antibakteriális aktivitást egyidejűleg értékeli, így eredményeit elsősorban viszonyításként lehet alkalmazni.

M. catarrhalis növekedését 25 µl/l-es koncentrációban egyformán volt képes gátolni a fahéjkéreg és citronella olaja is. Szintén kis mennyiséget alkalmazva erőteljes hatással rendelkezett a kakukkfű és borsmenta olaja is. Szegfűszeg és eukaliptusz esetén egyedül a magasabb koncentrációkban mutatkozott aktivitás.

Összefoglalva elmondható, hogy a vapor phase technika kifejezetten alkalmas illékony természetű anyagok antibakteriális hatásának gyors, egyszerű és gazdaságos vizsgálatára. Kiemelendő, hogy mivel az illóolajok leggyakoribb gyógyászati alkalmazása inhaláció útján történik, a légutakba be- és lejutó illékony komponensek által kialakított légtér hatását ez a módszer tudja legjobban modellezni *in vitro* körülmények között. A légúti kórképek kezelését kiegészítő terápiás alternatívák vizsgálata során ezért mindenképpen érdemes nem csak az illóolajnak a baktériumra direkt kapcsolat útján kifejtett hatását, hanem az illó összetevőket tartalmazó gőztér gátlását is megvizsgálni.

Az általunk alkalmazott módszer nagy előnye, hogy egyszerre több mikroorganizmussal szemben is megfigyelhető ugyanazon illóolaj aktivitása a vizsgálati körülmények változtatása nélkül. Kisebb hátrányt jelent azonban, hogy elsősorban azonos táptalajt és szaporodási körülményeket igénylő mikroorganizmusokat ajánlott egy elrendezésben

vizsgálni. A vapor phase vizsgálatok során a tesztbaktériumok mindegyikével szemben a fahéjkéreg illóolaja bizonyult a leghatékonyabbnak, a meghatározott gátló koncentrációk azonban a mikroorganizmusnak megfelelően igen nagy változékonyságot mutattak (MIC: 15,62-125 µl/l). Ezen kívül erős antibakteriális hatással rendelkezett a legtöbb baktériummal szemben a kakukkfű, a szegfűszeg, a borsmenta és a citronella illóolaja is. Eukaliptuszolaj esetén egyedül a Gram-negatív *Haemophilusok* és *M. catarrhalis* esetén detektáltunk jelentős aktivitást. Mint az irodalmi áttekintés során is említésre került korábbi tanulmányok szerint a Gram-pozitív törzsekhez képest a Gram-negatív baktériumok kevésbé fogékonyak az illóolajokra, köszönhetően a baktériumok antimikrobás szerekkel szembeni védekezési mechanizmusainak és külső membránjuk felépítésében lévő különbségnek (Burt 2004, Doran et al. 2009). Eredményeink Inouye és kutatócsoportjának megfigyeléseivel összhangban (2001a) inkább ennek a megfigyelésnek az ellenkezőjét látszanak igazolni, mivel az általunk meghatározott MIC értékek a Gram-negatív baktériumok többségénél, kivéve R-*P. aeruginosa*-t, alacsonyabbnak bizonyultak a Gram-pozitív törzsekével összehasonlítva. Ehhez kapcsolódóan valószínűsítik, hogy a gőzteres vizsgálatok során a baktérium külső membránja kevésbé befolyásolja az antibakteriális hatás kialakulását (Lopez et al 2005).

H. influenzae esetén kiemelendő, hogy egyedül ezzel a törzzsel szemben mutatott aktivitást az összes vizsgált illóolajunk, köztük az inkább bakteriosztatikus hatással rendelkező erdeifenyő olaj is. Korábbi tanulmányok szerint a törzs illóolajokkal szembeni érzékenysége a főként hidrofób karakterű külső membránjának köszönhető, amelyet igazolni látszik, hogy hasonlóan az illóolajokhoz a szintén hidrofób természetű makrolidok is jelentős hatékonyságúak a törzzsel szemben (Inouye 2001b). Mindezekre tekintettel a jövőben érdemes lenne egy-egy aktív illékony komponens hatását önmagában vagy más illóolajjal kombinálva is megvizsgálni vapor phase tesztrendszerben, valamint nagyobb figyelmet fordítani az illóolaj baktériumsejtben lezajló hatásmechanizmusaira, valamint biofilmgátló sajátságukra is.

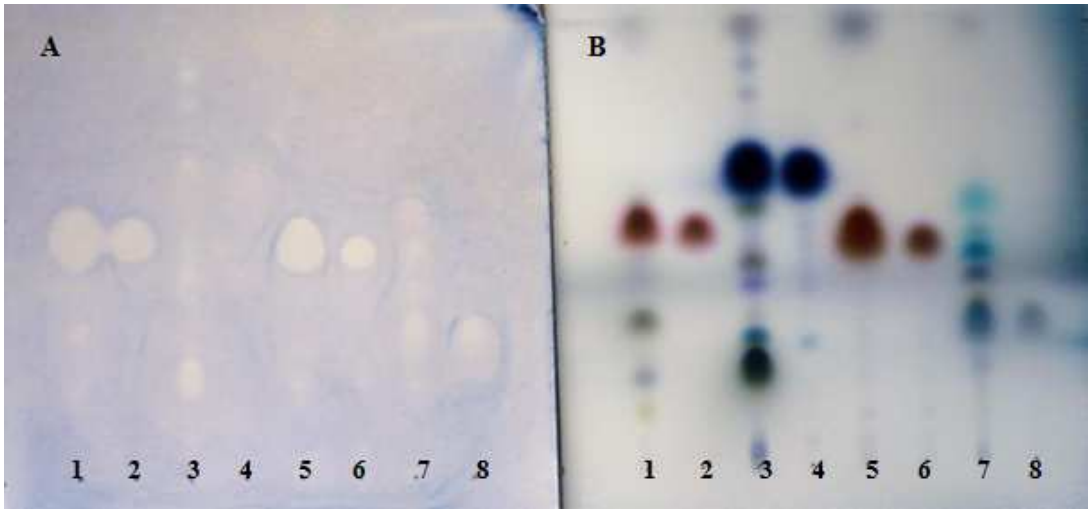
5.5 Illóolajok és illó-komponensek kölcsönhatásának értékelése

5.5.1 A direkt bioautográfiás vizsgálatok eredményei

5.5.1.1 Aktív illóolaj-komponensek kimutatása, minimális detektálható dózisuk meghatározása

Az egyes mikroorganzmusok esetén aktív komponensek meghatározásározásának eredményeként MRSA ellen a fahéjolajban lévő fahéjaldehidet, szegfűszeg esetén az eugenolt, borsmentaolajban a mentolt, kakukkfű esetén a timolt, citronellaolajban egyedül a geraniolt találtuk aktívnak, amelyeket részben korábbi megfigyelések is alátámasztanak (Horváth et al. 2010, Albano et al. 2016). *P. aeruginosa* esetén hasonló aktivitás volt megfigyelhető, emelett a citronellaolaj két másik komponense a citronellál és citrál esetén is tapasztaltunk gátlást (14. ábra), amely egybecseng Dorman és Deans (2000) tapasztalataival. Az említett kutatók a kisebb mennyiségben előforduló komponensek terpinén-4-ol, α-terpineol, β-pinén, nerol, és geranil-acetát aktivitásáról is említést tettek, ezért véleményünk szerint mindenképpen érdemes lenne további kölcsönhatást vizsgáló tesztekbe bevonni őket a jövőben.

R-*P. aeruginosa* ellen csupán a fahéjaldehid, timol és eugenol komponensek bizonyultak hatékonynak. A rétegek értékelését látható fényben végeztük el, az aktív komponensek meghatározása az azonos körülmények között elválasztott vanillin-kénsavas előhívóba mártott réteg segítségével történt (8. melléklet)



14. ábra: Aktív illóolajkomponensek kimutatása *P. aeruginosa* ellen direkt bioautográfiás módszerrel. **A:** direkt bioautográfia, **B:** vanillin-kénsavval előhívott réteg. **1:** kakukkfűolaj, **2:** timol, **3:** citronellaolaj, **4:** citronellál, **5:** szegfűszegolaj, **6:** eugenol, **7:** borsmentaolaj, **8:** mentol

A komponensek minimális detektálható dózisának meghatározására a kölcsönhatást vizsgáló tesztek kombinációinak összeállítása miatt volt szükségünk. Eredményeinket a 16. táblázat foglalja össze. R-*P. aeruginosa*-val szemben rezisztencia-profiljának köszönhetően a látható gátlás eléréséhez nagyobb mennyiségre volt szükség az adott hatóanyagokból. Az illóolajokkal végzett vizsgálatokkal ellentétben a fahéjaldehid esetén enyhébb aktivitást detektáltunk a többi komponenshez viszonyítva. Ennek alapján feltételezhető, hogy a fahéjolaj aktivitásához a kisebb mennyiségben jelenlévő komponensek is hozzájárulnak. Citrál és citronellál komponensekre a *P. aeruginosa* nagyobb érzékenységet mutatott MRSA-hoz viszonyítva, amely egybecseng az összillóolajolaj antibakteriális hatásának vizsgálatakor tapasztaltakkal.

16. táblázat: Illóolaj-komponensek minimális detektálható dózisa (MDD)

Komponens	**MDD (mg)**		
	MRSA	**R-*P. aeruginosa***	***P. aeruginosa***
Transz-fahéjaldehid	0,012	0,036	0,012
Timol	0,004	0,024	0,004
Eugenol	0,012	0,012	0,002
Mentol	0,006	n.a.	0,004
Geraniol	0,004	n.a.	0,010
Citrál	n.a.	n.a.	0,004
Citronellál	n.a	n.a.	0,032

n.a.: nincs aktivitás

5.5.1.2 Illóolaj-komponensek kölcsönhatásának értékelése

A direkt-bioautográfiás módszerrel tudomásunk szerint ez idáig még nem végeztek kombinációk kölcsönhatásait vizsgáló teszteket. Mivel a direkt módszer alkalmasnak bizonyult az antibaketriális hatás gyors és hatékony vizsgálatára, valamint a hatóanyagok aktivitási különbségeinek kimutatására, úgy véltük, mindenképpen érdemes ebből a szempontból is feltérképezni a tesztrendszer lehetőségeit. A kutatás eredményeként meghatároztuk a vizsgálati minták alkotóinak külön-külön létrehozott, valamint kombinációjuk esetén kifejtett gátlását. A gátlási zónák átmérőit a 17. táblázat foglalja össze. A mérési eredményeket ezután Mann-Whitney-Wilcoxon féle statisztikai analízisnek vetettük alá. Az elemzés célja volt, hogy megvizsgáljuk, a kombinációk által létrehozott gátlási zónák szignifikánsan eredményesebbnek tekinthetők-e a komponensekéhez viszonyítva. A mintapárokhoz tartozó szignifikanciaértékek a dolgozat 9. mellékletében kerültek feltüntetésre. Hatékonyabbnak tekintettük a kombináció által létrehozott gátlást

amennyiben az szignifikánsan nagyobbnak bizonyult az összetevők mindegyike által létrehozott gátlástól.

17. táblázat: Illóolaj-komponensek kölcsönhatásának értékelése direkt-bioautográfiás módszerrel

Baktériumtörzs	Kombináció	Gátlási zónák átmérője (mm±SD)	
		Komponens önálló	Kombináció
P. aeruginosa	Mentol Timol	2,57±0,23 3,24±0,38	3,97±0,25**
	Mentol Eugenol	2,41±0,33 2,74±0,31	3,03±0,31
	Mentol *Transz*-fahéjaldehid	2,09±0,16 2,81±0,19	3,19±0,65
	Geraniol Timol	3,37±0,08 3,87±0,28	3,70±0,09
	Citrál Timol	2,64± 0,19 3,02± 0,18	3,20± 0,28
	Citronellal Timol	3,42± 0,34 3,93± 0,46	4,01±0,41
	Citrál Citronellal	2,51± 0,42 3,08± 0,39	3,23± 0,40
	Geraniol Citrál	3,70± 0,27 3,21± 0,66	3,65± 0,22
	Geraniol Citronellal	3,49± 0,22 3,32± 0,78	3,53± 0,11
MRSA	Mentol Timol	4,01± 0,28 3,28± 0,25	4,11± 0,35
	Mentol Eugenol	3,36± 0,46 3,38± 0,28	4,28± 0,25**
	Mentol *Transz*-fahéjaldehid	3,58± 0,19 2,92± 0,07	4,38± 0,42**
	Geraniol Timol	2,46± 0,36 3,22± 0,30	3,36± 0,41
R-*P. aeruginosa*	*Transz*-fahéjaldehid Timol	4,57± 0,07 5,06± 0,14	5,72± 0,21**
	Timol Eugenol	5,99± 0,61 2,91± 0,61	5,30± 0,39
	Transz-fahéjaldehid Eugenol	4,04± 0,79 3,84± 0,56	4,23± 0,38

SD: szórásérték, **p<0,05

Ennek megfelelően *P. aeruginosa* esetén a mentol-timol keveréke, R-*P. aeruginosa* vizsgálatakor a *transz*-fahéjaldehid-timol kombinációja, MRSA esetén mentol-*transz*-

fahéjaldehid, mentol-eugenol elegye esetén mutattunk ki nagyobb hatékonyságot. A mentol-*transz*-fahéjaldehiddel, valamint a citronellaolaj komponenseinek egymással illetve timollal való kombinációjának kölcsönhatása tudomásunk szerint ez idáig nem került vizsgálatra a fent említett baktériumok ellen. A timol és mentol kombinációját MRSA ellen tesztelve esetünkben nem jelentkezett kifejezett antagonista kölcsönhatás, az eugenol és mentol kombinációja ezen felül jelentős aktivitást mutatott, amely ellentétben áll Gallucci és munkatársainak (2009) korábbi vizsgálataival. A geraniol és timol kombinációja MRSA ellen nem bizonyult aktívnak, amely a kutatócsoport előzetes, nem rezisztens törzsön végzett tesztjeinek eredményeivel egybecseng.

A citronellaolaj kevésbé aktív komponenseinek egymással és geraniollal való kombinációi esetén szintén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, amelynek alapján feltételezzük, hogy a citronellál és citrál komponens csak kisebb mértékben járul hozzá az eredményes hatás kifejtéséhez.

5.5.2 A checkerboard-titrálás eredményei

A direkt bioautográfiás vizsgálatokban kapott eredmények megerősítése céljából *P. aeruginosa* esetén a komponensek közötti kölcsönhatás vizsgálatára checkerboard-titrálást végeztünk. Ezen felül az adott komponenst nagy mennyiségben tartalmazó illóolajokat és kombinációikat is bevontuk vizsgálatainkba Sajnálatos módon a klinikai mintákból izolált humán patogén rezisztens törzsekkel szemben ebben a tesztrendszerben nem tudtunk vizsgálatokat végezni. A tesztek eredményeként meghatároztuk az egyes kombinációk FICI értékét, amelyet a 18. táblázatban összegeztünk. A meghatározásához elsőként az adott kombináció baktériumok növekedésére gyakorolt aktivitást értékeltük a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Amennyiben a növekedési százalék 10 alatti érték volt a 4.4.3.2 fejezetben leírtaknak megfelelően a két alkotó FIC meghatározására került sor, melyek összegéből nyertük a FICI értéket. A direkt-bioautográfiás vizsgálatokkal egybevágóan a checkerboard módszerrel is a mentol és timol komponensek között észleltünk szinergista kölcsönhatást, amely egybecseng a korábbi vizsgálatok tapasztalataival (Bassole et al. 2010) is.

Ezen felül a mentol eugenollal, valamint a borsmentaolaj kakukkfűolajjal készített keverékében szintén szinergista hatást detektáltunk. Érdekeség, hogy a borsmenta- és szegfűszeg olaj között kölcsönhatást nem tudtunk kimutatni. A mentol *transz*-fahéjaldehiddel készített keverékében az alkotók között nem észleltünk kölcsönhatást, míg a

borsmenta- és fahéjolaj esetén additív hatást regisztráltunk. Ennek megfelelően feltételezzük, hogy a kedvezőbb hatás kialakításában a kisebb százalékban jelen lévő illóolaj-komponensek jelentős szereppel rendelkeznek. Citronella- és kakukkfűolaj, valamint citronellál és timol között sajnálatos módon nem tapasztaltunk a baktériumok szaporodására gyakorolt megfelelő aktivitást, amely lehetővé tenné FICI értékük meghatározását.

18. táblázat: Illóolajok és illóolaj komponesek kölcsönhatásának értékelése checkerboard-titrálással

Kombináció		**MIC (mg/ml)**				**FICI**	**Kölcsönhatás**
		Komponens 1		**Komponens 2**			
Komponens 1	Komponens 2	MIC_e	MIC_k	MIC_e	MIC_k		
Mentol	Timol	1,50	0,19	3,10	0,77	0,38	**SZ**
Mentol	Eugenol	1,50	0,19	6,25	1,56	0,38	**SZ**
Mentol	*Transz*-fahéjaldehid	1,50	0,19	0,78	0,78	1,1	**nk**
Geraniol	Timol	6,25	3,13	3,10	0,39	0,63	**AD**
Citronellál	Timol	>100	n.a.	3,10	n.a.	-	**nk**
Borsmenta	Kakukkfű	6,25	0,78	3,12	0,39	0,25	**SZ**
Borsmenta	Szegfűszeg	6,25	3,13	3,12	3,12	1,50	**nk**
Borsmenta	Fahéj	6,25	0,78	3,12	1,55	0,63	**AD**
Citronella	Kakukkfű	6,25	n.a	3,12	n.a.	-	**nk**

MIC_e : komponens MIC értéke egyedül, MIC_k: komponens MIC értéke kombinációban, n.a: nincs aktivitás, SZ: szinergista, AD: additív, nk: nincs kölcsönhatás.

A direkt-bioautográfiás tesztek és checkerboard-titrálások eredményit összegezve elmondható, hogy *P. aeruginosa* esetén a legaktívabbnak a mentol-timol, valamint a borsmenta-kakukkfű kombinációját találtuk, a komponensek között szinergista hatás volt kimutatható. Figyelembe véve, hogy az ez idáig elvégzett vizsgálatok döntő többsége nem rezisztens *S. aureus*-on és *P. aeruginosa*-n történt érdemes volna vizsgálatainkat bővítve más légúti megbetegedést okozó, elsősorban rezisztens baktériumok ellen is további teszteket elvégezni. A kölcsönhatások mechanizmusa egyelőre nem teljesen tisztázott, korábbi tapasztalatok szerint azonban valószínűsíthető, hogy a mentolt, timolt és eugenolt tartalmazó kombinációk esetén a baktérium sejtmembránját károsító hatások együttese tehető felelőssé az antibakteriális hatásért (Trombetta et al. 2005). Eugenol esetében ezen felül sejten belüli enzimatikus folyamatok gátlása is szerepet játszik az aktivitásban (Pei et al. 2009). További vizsgálatok szükségesek azonban a mechanizmusok pontosítására, valamint a hatékony kombinációk citotoxicitásának meghatározására, hogy az eredmények megfelelő alapot képezzenek a későbbiekben *in vivo* vizsgálatok kivitelezésére.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antibiotikum-rezisztencia légúti patogének körében is egyre terjedő jelenségének köszönhetően az egészségügy részéről folyamatos igény mutatkozik olyan új terápiás alternatívák felfedezésére, amelyek hatékony kiegészítői lehetnek a légúti infekciók klasszikus antibakteriális kezelésének. A növényi illóolajok előnye, hogy inhaláció révén könnyen jutnak be a légutakban, ezen felül komplex összetételük miatt több támadáspontot érintő hatásmechanizmusuknak köszönhetően hatékonyan veszik fel a harcot a rezisztens baktériumokkal szemben is. Gyógyászati alkalmazásuk elsősorban a tradícionális felhasználáson alapul, így számos esetben nem rendelkezünk pontos információkkal megfelelő terápiás dózisuk kiválasztását illetően. Ennélfogva fontos lenne felderíteni antibakteriális hatásukat, valamint kombinációik hatékonyságát a légúti fertőzések esetében is. Az erdeifenyő, eukaliptusz, borsmenta, kakukkfű és szegfűszeg illóolaja számos, a megfázás tüneteit enyhítő, köhögéscsillapító és köptető gyógyszerben található meg, ezen felül a Szabványos Vényminták gyűjteményben is hasonló indikációban fordulnak elő.

Kutatásunk célja volt légúti kórképek terápiájában eredményesen alkalmazható illóolajok (fahéjkéreg, szegfűszeg, erdeifenyő, eukaliptusz, borsmenta, citronella és kakukkfű) vizsgálata, valamint a mikrobiológiai szempontból kevésbé kutatott *A. adamsii* Besser illóolajának analízise. Vizsgálatainkat a csőhígítás és direkt bioautográfia módszerén túl az inhalációs körülményeket legjobban modellező gőzteres technika (vapor phase módszer) eredményeivel egészítettük ki. A vapor phase módszer előnye, hogy a klasszikus technikákkal ellentétben kiküszöböli az illóolajok fizikai-kémiai sajátságaiból adódó korlátozó tényezőket, valamint közvetlen információt szolgáltat az illékony komponensek által kialakított gőztér antibakteriális hatásáról.

Az új terápiás alternatívák felkutatása mellett egyre nagyobb népszerűségnek örvend a már meglévő hatóanyagok egymással és más természetes anyagokkal való kombinációja, amely a rezisztencia elleni küzdelem egy ígéretes területe lehet. Bár az illóolajok és komponenseik kombinációit az élelmiszeriparban már régóta alkalmazzák, gyógyászati lehetőségeikről egyelőre kevés információ áll rendelkezésünkre. Ennélfogva célul tűztük ki mikrobiológiailag aktív illóolajok és komponenseik kombinációinak kölcsönhatás-értékelését a légúti infekciókban előforduló rezisztens baktériumokra fókuszálva.

Kutatásunk eredményeit az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Gázkromatográfiás vizsgálatainkban meghatároztuk az eddig kevésbé kutatott *Artemisia adamsii* illóolajának összetételét.
2. Direkt bioautográfia módszerét alkalmazva elsőként igazoltuk az *A. adamsii* illóolajának MRSA-ellenes aktivitását. Elsőként mutattuk ki, hogy az antibakteriális hatás nem az illóolaj fő komponenseihez köthető, hanem annak kisebb százalékban jelen lévő terpén-alkohol összetevőihez.
3. Elsőként írtuk le a citronella illóolaj MRSA ellenes hatását direkt bioautográfiás rendszerben.
4. Ugyancsak elsőként igazoltuk illóolajaink által képzett gőzterek antibakteriális hatékonyságát antibiotikum-rezisztens baktériumtörzsekkel (MRSA, R-*P. aeruginosa*) szemben. A vizsgált illóolajok közül a fahéjkéreg bizonyult a leghatékonyabbnak (MIC: 31,25-125 µl/l), azonban erős gátló hatással rendelkezett a kakukkfű, a szegfűszeg és a borsmenta, valamint a citronella illóolaja által kialakított gőztér is. R-*P. aeruginosa* esetén kizárólag a fahéjkéreg esetén volt észlelhető antibakteriális aktivitás.
5. Az általunk alkalmazott vapor phase tesztrendszert sikeresen optimalizáltuk különleges táptalajigényű légúti baktériumtörzsek esetén is, ezáltal elsőként detektáltuk a fahéjkéregolaj, a kakukkfű és a szegfűszeg gőzterének antibakteriális hatását *H. parainfluenzae*-vel szemben. A *Cymbopogon nardus* illóolaj antibakteriális hatásának gőztérben történő értékelését elsőként végeztük el légúti baktériumok ellen. Az általunk vizsgált illóolajok antibakteriális hatását *S. mutans* és *M. catarrhalis* ellen gőzteres tesztrendszerben elsőként írtuk le.
6. A borsmentaolaj gőzterének antibakteriális hatását első ízben írtuk le *H. parainfluenzae* ellen, amelyet összevetve a *H. influenzae*-vel szemben kifejtett gátlással az illóolaj jelentős különbséget mutatott. Várakozásainkkal ellentétben a légúti panaszok enyhítésére a borsmenta mellett leggyakrabban alkalmazott eukaliptusz és erdeifenyő illóolaja tesztrendszerünkben a Gram-pozitív baktériumok és *P. aeruginosa* ellen hatástalannak bizonyult. Kiemelendő hogy az erdeifenyő olajának gőztere egyedül *H. influenzae* ellen eredményezett gátlást, valamint az eukaliptusz olaja is csupán magasabb koncentrációban volt aktív a *Haemophilus* törzsek és *M. catarrhalis* ellen.
7. Csőhígításos vizsgálataink során az illóolajat folyékony közegben vizsgálva elsőként írtuk le a citronella és erdeifenyő olajának antibakteriális hatását *H. influenzae* esetén. A fent említett olajok mellett a szegfűszeg, a kakukkfű és a borsmenta olajának aktivitását

szintén elsőként vizsgáltuk *H. parainfluenzae*-vel szemben. Eredményeink tükrében mindenképpen kiemelendő, hogy a szegfűszeg illóolaja elsősorban a csőhígítás esetén rendelkezett nagyobb aktivitással MRSA és *S. pyogenes* ellen. A kakukkfű olaja ehhez hasonlóan *S. mutans* és *M. catarrhalis* tekintetében nagyobb hatékonyságot mutatott a vapor phase technika eredményeihez viszonyítva. Ennélfogva úgy véljük, hogy a szegfűszeg és kakukkfű olaja inkább folyékony állapotban és a kezelendő felülettel kialakított direkt kontaktusban alkalmazható eredményesebben. Ezzel szemben a gőzteres vizsgálatokban legnagyobb aktivitást mutató fahéjkéregolaj alkalmazása inhaláció útján ajánlott alacsony koncentrációban alkalmazva.

8. Az illóolajok és komponensei kölcsönhatásának vizsgálatára első ízben alkalmaztuk a direk bioautográfia módszerét. Statisztikai analízissel együtt alkalmazva úgy véljük, a módszer a hatékony kombinációk gyors és költséghatékony tesztelésére megfelelőnek tekinthető. Hátránya, hogy a komponensek közötti additív hatások nehezen határozhatók meg vele.
9. Kölcsönhatást vizsgáló tesztek során elsőként vizsgáltuk a borsmentaolaj kakukkfű-, fahéj- és szegfűszegolajjal, valamint a kakukkfűolaj citronellaolajjal alkotott kombinációját *P. aeruginosa* esetén checkerboard-titrálással. A mentol fahéjaldehiddel, a citrál, citronellál és geraniol egymással illetve timollal alkotott keverékeinek aktivitását szintén első ízben értékeltük az említett baktériummal szemben. Rezisztens *P. aeruginosa* esetén a *transz*-fahéjaldehid timollal és eugenollal, valamint az eugenol timollal készített kombinációjának hatékonyságát elsőként kíséreltük meg értékelni. A mentol-eugenol, illetve mentol-*transz*-fahéjaldehid keverék fokozott aktivitását MRSA esetén szintén nem mutatták ki ez idáig.

Az antibakteriális hatás értékelését az egyes tesztrendszerek alkalmazásnak tükrében a 19. táblázat foglalja össze.

Kutatásunk eredményei igazolják, hogy az általunk vizsgált illóolajok és komponenseik kombinációinak egy része jelentős antibakteriális hatással rendelkezik multirezisztens törzsek esetén is. Ennélfogva az antibakteriális terápia hatékony kiegészítői lehetnek az orvosi/gyógyszerészi gyakorlatban. További citotoxicitási vizsgálatok elvégzése szükséges azonban az illóolajok biztonságos alkalmazásának igazolásához, valamint *in vitro* és *in vivo* kifejtett hatásmechanizmusuk részletes megismerése szempontjából. Eredményeink kiindulási alapul szolgálhatnak új, illóolaj-tartalmú, légúti kórképek kezelésére szánt gyógyszerek fejlesztéséhez is.

Az illóolajok antibakteriális hatásvizsgálatával foglalkozó közlemények és saját megfigyeléseink alapján megfontolandó lenne ezen felül, hogy a Szabványos Vénymintákban található illóolajokat tartalmazó készítmények receptúrái módosításra kerüljenek.

19. táblázat: Az illóolajok antibakteriális hatásának összefoglalása különböző *in vitro* tesztrendszerekben

Illóolaj	**Direkt bioautográfia**	**Csőhígítás**	**Vapor phase technika**
Fahéjkéreg	1, **2**, **3**	1, **2**, **3**, 4, **5**, 6, **7**, **8**, 9	**1-9**
Kakukkfű	1, 2, 3	1, 3, 4, 5, **6**, 7, 8, **9**	1, **3**, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Szegfűszeg	**1**, 2, 3	**1**, 3, **4**, 5, 6, 7, 8, 9	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Borsmenta	1,3	4, 5, 6, 7, 8, 9	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Citronella	1,3	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9	1, 4, 5, 6, 7, 8, **9**
Eukaliptusz	1	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	5, 7, 8, 9
Erdeifenyő	3	4, 5, 6, 7, 8, 9	7
A. adamsii	1	-	-

A táblázatban az illóolajok által hatásosan gátolt baktériumok kerültek feltüntetésre, kiemelve az ellenük leghatásosabb illóolajat az adott rendszerben. **1:** MRSA; **2:** R-*P. aeruginosa*; **3:** *P. aeruginosa*; **4:** *S. pyogenes*; **5:** *S. pneumoniae*; **6:** *S. mutans*; **7:** *H. influenzae*; **8:** *H. parainfluenzae*; **9:** *M. catarrhalis*

A jövőben az aktív komponensek kombinációinak ígéretes eredményeit mindenképpen érdemes más légúti patogének bevonásával is bővíteni, illetve az eredményeket *in vivo* vizsgálatok tervezéséhez felhasználni. Ezen felül szükséges lenne a rezisztens törzsekre fókuszálva a klasszikus antimikrobás szerek és illó komponensek kombinációs terápiájának vizsgálatára is nagyobb hangsúlyt fektetni.

7. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

Abena A.A., Gbenou J.D., Yayi E., Moudachirou M., Ongoka R.P., Ouamba J.M., Silou T. (2007). Comparative chemical and analgesic properties of essential oils of *Cymbopogon nardus* (L.) rendle of Benin and Congo. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 4(2): 267-272.

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

Adrar N., Oukil N., Bedjou F. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. Industrial Crops and Products. 88: 112-119.

Ahmad A., Viljoen A. (2015). The *in vitro* antimicrobial activity of Cymbopogon essential oil (lemongrass) and its interaction with silver ions. Phytomedicine. 22: 657-665.

Albano M., Bérgamo Alves F.C., Murbach Teles Andrade B.F., Nunes Barbosa L., Marques Pereira A.F., de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M., Mores Rall V.L., Fernandes Júnior A. (2016). Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 38: 83-90

Al Yousef S.A. (2014). Essential oils: their antimicrobial activity and potential application against pathogens by gaseous contact - a review. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. 6(1): 37-54.

Aleksic V., Mimica-Dukic N., Simin N., Nedeljkovic N.S., Knezevic P. (2014). Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. Phytomedicine. 21(12): 1666-74.

Alva M., Popich S., Borkosky S., Cartagena E., Bardón A. (2012) Bioactivity of the Essential Oil of an Argentine Collection of *Acanthospermum hispidum* (*Asteraceae*). Natural Product Communications. 7(2): 245-248.

Azeredo C.M.O., **Soares M.J.** (2013). Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. Revista Brasileira de Farmacognosia. 23:762-768.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. Food and Chemical Toxicology. 46: 446-475.

Bassolé I.H.N., Lamien-Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., Novak J., Nebié R.C., Dicko M.H. (2010). Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha* x *piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. Molecules. 15: 7825-7839.

Bassolé I.H.N., Lamien-Meda A., Bayala B., Obame L.C., Ilboudo A.J., Franz C., Novak, J., Nebié R.C., Dicko M.H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. Phytomedicine. 18: 1070-1074.

Bassolé I.H.N., **Juliani H.R.** (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules. 17: 3989-4006.

Bassyouni R.H., Kamel Z., Abdelfattah M.M., Mostafa E. (2016). Cinnamon oil: A possible alternative for contact lens disinfection. Contact Lens and Anterior Eye. 39: 277-283.

Beltrán-Villalobos K.L., Déciga-Campos M., Aguilar-Mariscal H., González-Trujano M.E., Martínez-Salazar M.F., Ramírez-Cisneros M.L.Á., Rios M.Y., López-Muñoz F.J. (2017). Synergistic antinociceptive interaction of *Syzygium aromaticum* or *Rosmarinus officinalis* coadministered with ketorolac in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 94: 858-864.

Ben-Fadhel Y., Saltaji S., Khlifi M.A., Salmieri S., Dang Vu K., Lacroix M. (2017). Active edible coating and γ-irradiation as cold combined treatments to assure the safety of broccoli florets (*Brassica oleracea* L.). International Journal of Food Microbiology. 241: 30-38.

Block L.L., Goon D.J.W., Rolf. D. (2000). United States Patent: Inhalation therapy decongestant with foraminous carrier. US 6,090,403, 18 July 2000.

Bohlmann F., Hartono L., Jakupovic J., Huneck S. (1985). Guaianolides related to arborescin from *Artemisia adamsi*. Phytochemistry. 24 (5): 1003-1007.

Boonyanugomola W., Kraisriwattanaa K., Ruksereea K., Boonsamb K., Narachai P. (2017). *In vitro* synergistic antibacterial activity of the essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. Journal of Infection and Public Health. 10: 586-592.

Botz L., Kocsis B., Nagy S. (2001). Detection of microbiologically active compounds. In: Planar Chromatography. Nyiredi Sz. (Ed). Springer. Budapest. 489-516.

Bouhdid S., Abrinin J., Amensour M., Zhri A., Espuny M.J., Manresa A. (2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells

induced by *Cinnamomum verum* essential oil. Journal of Applied Microbiology. 109: 1139-1149.

Burt S.A., van der Zee R., Koets A.P., De Graaff A.M., van Knapen F., Gaastra W., Haagsmann H.P., Veldhuizen E.J.A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology. 73: 4484-4490.

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.

Braga P.C., Sasso M.D., Culici M., Alfieri M. (2007). Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. Fitoterapia. 78: 396-400.

Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Ricke S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. Food Control. 54:111-119.

Campos-Requena V.H., Rivas B.L., Pérez M.A., Figueroa C.R., Figueroa N.E., Sanfuentes E.A. (2017).Thermoplastic starch/clay nanocomposites loaded with essential oil constituents as packaging for strawberries - *In vivo* antimicrobial synergy over *Botrytis cinerea*. Postharvest Biology and Technology. 129: 29-36.

Cao B., Wang H., Sunb H., Zhua Y., Chen M. (2004). Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. Journal of Hospital Infection. 57(2): 112-118.

Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K., Weber M. (2005). The global burden of Group A Streptococcal diseases. The Lancet Infectious Diseases. 5: 685-694.

Cermelli C., Fabio A., Fabio G., Quaglio P. (2008). Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. Current Microbiology. 56:89-92.

Charles M.K., Berenger B.M., Turnbull L., Rennie R., Fuller J. (2016). Variability of β-lactam susceptibility testing for *Streptococcus pneumoniae* using 4 commercial test methods and broth microdilution. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 84: 240-245.

Choi O., Cho S.K., Kim J., Park C.G., Kim J**.** (2016). *In vitro* antibacterial activity and major bioactive components of *Cinnamomum verum* essential oils against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 6(4): 308-314.

Clemente I., Aznar M., Silva F. Nerín C. (2016). Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 36: 26-33.

Choma I.M., Grzelak E.M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A. 1218: 2684-2691.

Cornu A., Carnat A.P., Martin B., Coulon J.B., Lamaison J.L., Berdague J.L. (2001). Solid-phase microextraction of volatile components from natural grassland plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49 (1): 203-209.

Csupor D., Szendrei K. (2012). Gyógynövénytár. Útmutató a korszerű gyógynövény-alkalmazáshoz. 2., bővített, javított kiadás. Medicina Kiadó. Budapest. 96-113, 195-208, 337-341.

Derakhshan S., Sattari M., Bigdeli M. (2008). Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. International Journal of Antimicrobial Agents. 32: 432-436.

De Sousa E.O., Rodrigues F.F., Campos A.R., Lima S.G., da Costa J.G. (2013). Chemical composition and synergistic interaction between aminoglycosides antibiotics and essential oil of *Lantana montevidensis* Briq. Natural Product Research. 27(10): 942-945.

Didry N., Dubreuil L., Pinkas M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. Pharmaceutica Acta Helvetiae. 69: 25-28.

Doran A.L., Morden W.E., Dunn K., Edwards-Jones V. (2009). Vapor-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. Letters in Applied Microbiology. 48. 387-392.

Dorman H.J.D., Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 88: 308-316.

ESCOP Monographs (2003). The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. 2nd edition. Thieme. Stuttgart. pp. 92-97, 150-156, 329-336, 505-510.

Evani B.M. (2007). United States Patent Application Publication: Inhaler Device. US 2007/0144512, 28 June 2007.

Fabio A., Cermelli C., Fabio G., Nicoletti P., Quaglio P. (2007). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. Phytotherapy Research. 21: 374-377.

Faleiro M.L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. In: Méndez-Vilas A. (Ed). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Vol. 2. Badajoz. Spain. Edition Microbiology book series-2011, Formatex Research Center. 1143-1156.

Faleiro M.L., Miguel M.G. (2012). Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria In: Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components. Rai M.K., Kon K.V. (Eds). Academic Press, Elsevier. UK. 65-94.

Felső P., Horváth Gy., Bencsik T., Godányi R., Lemberkovics É., Böszörményi A., Böddi K., Takátsy A., Molnár P., Kocsis B**.** (2013). Detection of the antibacterial effect of essential oils on outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* by lab-on-a-chip and MALDI-TOF/MS. Flavour and Fragance Journal. 28: 367-372.

Fei L., Yi-cheng D., Xing-qian Y., Yu-ting D. (2011). Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. Agricultural Sciences in China. 10(9): 1482-1487.

Forstner C., Rohde G., Rupp J., Schuette H., Ott S.R., Hagel S., Harrison N., Thalhammer F., Baum H., Suttorp N., Welte T., Pletz M.W. (2016). Community-acquired *Haemophilus influenzae* pneumonia-New insights from the CAPNETZ study. Journal of Infection. 72: 554-563.

Fu Y.J., Zu Y.G., Chen L.Y., Shi X.G., Wang Z., Sun S., Efferth T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytotherapy Resarch. 21: 989-994.

Gallucci M.N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygadlo J., Demo M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Flavour and Fragrance Journal. 24: 348-354.

Ghabraie M., Vu K.D., Tata L., Salmieri S., Lacroix M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. LWT - Food Science and Technology. 66: 332-339.

Goldbeck J.C., Edmilson do Nascimento J., Jacob R.G., Fiorentini A.M., Padilha da Silva W. (2014). Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. Industrial Crops and Products. 60: 304-309.

Goñi P., López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R., Nerín C. (2009). Antimicrobial activity in the vapor phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry. 116: 982-989.

Gould I.M., David M.Z., Esposito S., Garau J., Lina G., Mazzei T., Peters G. (2012): New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. International Journal of Antimicrobial Agents. 39: 96-104.

Grosjean D., Williams E.L., Seinfeld J.H. (1992). Atmospheric oxidation of selected terpenes and related carbonyls - Gas-phase carbonyl products. Environmental Science & Technology. 26: 1526-1533.

Gupta P., Patel D.K., Gupta V.K., Pal A., Tandon S., Darokar M.P. (2017). Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Phytomedicine. 34: 85-96.

Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology. 124: 91-97.

Helander I. M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., Von Wright A**.** (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 3590-3595.

Hemaiswarya S., Doble M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram-negative bacteria. Phytomedicine. 16: 997-1005.

Hendry E.R., Worthington T., Conway B.R., Lambert P.A. (2009). Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 64: 1219-1225.

Hill L.E., Gomes C., Taylor T.M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. LWT - Food Science and Technology. 51: 86-93

Hindler J.A., Jorgensen J.H. (2011). Susceptibility test methods: Fastidious bacteria. In: Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. Versalovic J. (Ed). ASM. Washington DC. 1180-1187.

Hiramatsu K. (2001). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. The Lancet Infectious Diseases 1: 147-155.

HMPC Monograph (2011): Community herbal monograph on *Syzygium aromaticum* (L.) Merill et L. M. Perry, floris aetheroleum. EMA/HMPC/534924/2010. 27 January 2011.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_Community_herbal_monograph/2011/02/WC500102023.pdf [letöltve: 2016.06.02]

Hollander M., Wolfe D.A. (1999). Nonparametric Statistical Methods. Second edition. John Wiley & Sons. New York. 68-75.

Hood J.R., Wilkinson J.M., Cavanagh H.M.A. (2003). Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. Journal of Essential Oil Research. 15(6): 428-433.

Horváth Gy., Jámbor N., Végh A., Böszörményi A., Lemberkovics É., Héthelyi É., Kovács K., Kocsis B**.** (2010). Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. Flavour and Fragrance Journal. 25: 178-182.

Horváth Gy., Jámbor N., Kocsis E., Böszörményi A., Lemberkovics É., Héthelyi É., Kovács K., Kocsis B. (2011). Role of direct bioautographic method for detection of antistaphylococcal activity of essential oils. Natural Product Communications. 6(9): 1379-1384.

Horváth Gy., Török Jenei J., Vágvölgyi Cs., Böszörményi A., Krisch J. (2016). Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. Acta Biologica Hungarica. 67(2): 205-214.

Hossain F., Follett P., Vu K.D., Harich M., Salmieri S., Lacroix M. (2016). Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. Food Microbiology. 53: 24-30.

Houdkova M., Rondevaldova J., Doskocil I., Kokoska L. (2017) Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. Fitoterapia. 118: 56-62.

Hymes A.C., Ong L.T., Persons G.R. (1987). United States Patent: Drug dispensing device for transdermal delivery of medicaments. US 4,675,009, 23 June 1987.

Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, and interactions with food matrix components. Frontiers in Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012

Iannitelli A., Grande R., Stefano A.D., Giulio M.D., Sozio P., Bessa L.J., Laserra S., Paolini C., Protasi F., Cellini L. (2011). Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. International Journal of Molecular Science. 12: 5039-5051.

Ilić B.S., Kocić B.D., Cirić V.M., Ćvetković O.G., Miladinović D.L. (2014). An *in vitro* synergistic interaction of combinations of *Thymus glabrescens* essential oil and its main constituents with chloramphenicol. Scientific World Journal. doi: 10.1155/2014/826219.

Inouye S., Abe S., Yamaguchi H., Asakura M. (2003). Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. International Journal of Aromatherapy. 13: 33-41.

Inouye S., Nishiyama Y., Yamagughi H. (2001a). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 47: 565-573.

Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T. (2011b). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. Journal of Infection and Chemotherapy. 7: 251-254.

Kanayama S., Ikeda F., Okamoto K., Nakajima A., Matsumoto T., Ishii R., Amano A., Matsuzaki K., Matsumoto S. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of ozenoxacin against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* and *Streptococcus pyogene*s isolated from clinical cutaneous specimens in Japan. Journal of Infection and Chemotherapy. *In press*. doi: 10.1016/j.jiac.2016.03.006.

Karatzas A.K., Kets E.P.W., Smid E.J., Bennik M.H.J. (2001). The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Applied Microbiology. 90: 463-469.

Katikia L.M., Barbieria A.M.E, Araujob R.C., Veríssimoa C.J., Louvandinic H., Ferreira J.F.S. (2017). Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus in vitro*. Veterinary Parasitology. 243: 47-51.

Kawarai T., Narisawa N., Yoneda S., Tsutsumi Y., Ishikawa Y., Hoshinof Y., Senpukua H. (2016). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation using extracts from Assam tea compared to green tea. Archives of Oral Biology. 68: 73-82.

Kloucek P., Smid J., Frankova A., Kokoska L., Valterova I., Pavela R**.** (2012a). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. Food Research International. 47: 161-165.

Kloucek P., Smid J., Flesar J., Havlik J., Titera D., Rada V., Drabek O., Kokoska L. (2012b). *In vitro* inhibitory activity of essential oil vapors against *Ascosphaera apis*. Natural Product Communications. 7(2): 253-256.

Kolins M.C. (2010). United States Patent Application Publication: Personal aromatherapy device, US 2010/0001093, 7 January 2010.

Knezevic P., Aleksic V., Simin N., Svircev E., Petrovic A., Mimica-Dukic N. (2016). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Ethnopharmacology. 178: 125-136.

Kon K.V., Rai M.K. (2012). Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. Expert Review of Anti-infective Therapy. 10: 775-790.

Kon K.V. Rai M.K. (2013). Combining essential oils with antibiotics and other antimicrobial agents to overcome multidrug-resistant bacteria In: Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components. Rai M.K., Kon K.V. (Eds). Elsevier. USA. 149-164.

Koshkelashvili N., Shah M., Codolosa J.N., Climaco A. (2016). Polymicrobial infective endocarditis caused by *Neisseria sicca* and *Haemophilus parainfluenzae*. IDCases. 4: 3-5.

Kovács J., Horváth Gy., Kerényi M., Kocsis B., Emődy L., Schneider Gy. (2016). Modified bioautographic method for antibacterial component screening against anaerobic and microaerophilic bacteria. Journal of Microbiological Methods. 123: 13-17.

Kremmer T., Torkos K. (2010). Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata. Akadémia Kiadó. Budapest.

Lahmar A., Bedoui A., Mokdad-Bzeouich I., Dhaouifi Z., Kalboussi Z., Cheraif I., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. (2017). Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. Microbial Pathogenesis. 106: 50-59.

Laird K., Phillips C. (2011). Vapor phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? Letters in Applied Microbiology. 54. 169-174.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology. 91: 453-462.

Langeveld W.T., Veldhuizen E.J., Burt S.A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. Critical Review Microbiology. 40(1): 76-94.

Leroux-Roels G., Van Damme P., Haazen W., Shakib S., Caubet M., Aris E., Devaster J.M., Peeters M. (2016). Phase I, randomized, observer-blind, placebo-controlled studies to evaluate the safety, reactogenicity and immunogenicity of an investigational non-*typeable Haemophilus influenzae* (NTHi) protein vaccine in adults. Vaccine. 34: 3156-3163.

Li S., Chen F., Jia J., Liu Z., Gu H.,Yang L., Wang F., Yang F. (2016). Ionic liquid-mediated microwave-assisted simultaneous extraction and distillation of gallic acid, ellagic acid and essential oil from the leaves of *Eucalyptus camaldulensis*. Separation and Purification Technology. 168: 8-18.

Livermore D.M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa:* our worst nightmare? Clinical Infectious Diseases. 34: 634-640.

Lopez P., Sanchez C., Batlle R., Nerin C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 6939-6946.

Lóránd T., Kocsis B., Sohár P., Nagy G., Pál J., Kispál Gy., László R., Prókai L. (2002). Synthesis and antibacterial activity of fused Mannich ketones. European Journal of Medicinal Chemistry. 37: 803-812.

Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., Berti L., Pagès J.M., Amaral L., Bolla J.M. (2009). Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-negative species. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53(5): 2209-2211.

Ma Q., Fan X.D., Liu X.C., Qiu T.Q., Jiang J.G. (2015). Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of essential oils from *Kaempferia galangal* L. and their comparative antioxidant activities. Separation and Purification Technology. 150: 73-79.

Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás (2010). IV/A, IV/B kötet. Medicina Könyvkiadó. Budapest. 7721-8030.

Mahboubi M., Bidgoli G.F. **(2010).** Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. Phytomedicine. 17: 548-550.

Marino M., Bersani C., Comi G**.** (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. International Journal of Food Microbiology. 67: 187-195.

Matan N., Rimkeeree H., Mawson A.J., Chompreeda P., Haruthaithanasan V., Parker M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. International Journal of Food Microbiology. 107: 180-185.

Miladi H., Zmantar T., Kouidhi B., Al Qurashi Y.M.A., Bakhrouf A., Chaabouni Y., Mahdouani K., Chaieb K. (2017). Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ-terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. Microbial Pathogenesis. 112: 156-163.

Miladinović D.L., Ilić B.S., Kocić B.D., Cirić V.M., Nikolić, D.M. (2015a). Antibacterial investigation of thyme essential oil and its main constituents in combination with tetracycline. Journal of Medicinal Food. 18(8): 935-937.

Miladinović D.L., Ilić B.S.,Kocić B.D., Miladinović L.C., Markovic M.S. (2015b). *In vitro* interactions of *Peucedanum officinale* essential oil with antibiotics. Natural Product Research. 29: 972-975.

Mohamed A.E.H.H., El-Sayed M.A., Hegazy M.E., Helaly S.E., Esmail A.M., Mohamed N.S. (2010). Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba.* Records of Natural Products. 4(1): 1-25.

Moleyar V., Narasimham P. (1992). Antibacterial activity of essential oil components. International. Journal of Food Microbiology. 16: 337-342.

Mondello F., Girolamo A., Scaturro M., Ricci M.L. (2009). Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapor controlled conditions. Journal of Microbiological Methods. 77: 243-248.

Móricz Á.M., Horváth Gy., Molnár P., Kocsis B., Böszörményi A., Lemberkovics É., Ott P.G. (2010). Investigation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil by use of the BioArena system. Journal of Planar Chromatography. 23(6): 406-410.

Mulyaningsih S., Sporer F., Zimmermann S., Reichling J., Wink M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens, Phytomedicine. 17: 1061-1066 .

Mulyaningsih S., Sporer F., Reichling J., Wink M. (2011). Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. Pharmaceutical Biology. 49(9): 893-899.

Murphy T.F., Parameswaran G.I. (2009). *Moraxella catarrhalis,* a human respiratory tract pathogen. Clinical Infectious Diseases. 49:124-131.

Müller Zs. (2015): Felső légúti infekciók tünetei és antibiotikum-kezelés felnőttkorban. Gyógyszerész Továbbképzés. 9(6): 167-171.

Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals. 6(12):1451-174.

Nedorostova L., Kloucek P., Kokoska L., Stolcova M., Pulkrabek J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapor phase against foodborne bacteria. Food Control. 20: 157-160.

Orafidiya L.O. (1993): The effect of autoxidation of lemon-grass oil on its antibacterial activity. Phytotherapy Research. 7: 269-271.

Országos Gyógyszerészeti Intézet (2003). Formulae Normales - Szabványos Vényminták. Gyógyszerészi Kiadás. VII. kiadás. Melania kiadó. Budapest.

Pál T. (2013): Az orvosi mikrobiológia tankönyve. Pál T. (Ed.). Medicina Könyvkiadó. Budapest.

Pasdaran A., Sheikhi D. (2016). Volatile oils: potential agents for the treatment of respiratory infections. In: The Microbiology of Respiratory System Infections. Rai M., Kon K. (Eds). Elsevier. USA. 237-262.

Paster N., Juven B.J., Shaaya E., Menasherov M., Nitzan R., Weisslowicz H., Ravid U. (1990). Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. Letters in Applied Microbiology. 11: 33-37.

Patel J.B., Tenover F.C., Turnidge J.D., Jorgensen J.H. (2011): Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. Versalovic J. (Ed). ASM. Washington DC. 1122-1143.

Pauli A., Schilcher H. (2016). *In vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 8th edition. In: Handbook of essential oils. Science, technology, and application. Second Edition. Can Baser K.H., Buchbauer G. (Eds). Boca Raton. CRC Press. Taylor & Francis Group. 433-618.

Pei R.S., Zhou F., Ji B.P., Xu J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. Journal of Food Science. 74: 379-383.

Pereira V., Dias C., Vasconcelos M.C., Rosa E., Saavedra M.J. (2014). Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). Industrial Crops and Products. 52: 1-7.

Pereira N.L.F., Aquino P.E.A., Júnior J.G.A.S., Cristo J.S., Vieira Filho M.A., Moura F.F., Ferreira N.M.N. et al. (2017). Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. 174: 144-149.

Pyankov O., Usachev E., Pyankova O., Agranovski I. (2012). Inactivation of airborne influenza virus by tea tree and eucalyptus oils. Aerosol Science and Technology. 46(12): 1295-1302.

Que Y., Moreillon P. (2010). *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal Toxic Shock). In: Principles and Practice of Infectious Diseases 7th edition. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (Eds.). Churchill Livingstone Elsevier. USA. 2543-2578.

Rácz G., Rácz-Kotilla E., Szabó L.Gy. (2012). A fitoterápia és az alternatív medicina alapjai. Galenus Kiadó. Budapest.

Redasani V.K., Bari S.B. (2012). Synthesis and evaluation of mutual prodrugs of ibuprofen with menthol, thymol and eugenol. European Journal of Medicinal Chemistry. 56: 134-138.

Reegan A.D., Kannan R.V., Paulraj M.G., Ignacimuthu S. (2014). Synergistic effects of essential oil-based cream formulations against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Journal of Asia-Pacific Entomology. 17: 327-331.

Rios J.L., Recio M.C., Villar A**.** (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. Journal of Ethnopharmacology. 23: 127-149.

Riou M., Carbonnelle S., Avrain L., Mesaros N., Pirnay J.P., Bilocq F., De Vos D., Simon A., Piérard D., Jacobs F., et al. (2010). *In vivo* development of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the lower respiratory tract of Intensive Care Unit patients with nosocomial pneumonia and receiving antipseudomonal therapy. International Journal of Antimicrobial Agents. 36: 513-522.

Rodenak Kladniew B., Polo M., Montero Villegas S., Galle M., Crespo R., García de Bravo M. (2014). Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines. Chemico-Biological Interactions. 214: 57-68.

Rogiers G., Kebede B.T., Van Loey A., Michiels C.W. (2017). Membrane fatty acid composition as a determinant of *Listeria monocytogenes* sensitivity to trans-cinnamaldehyde. Research in Microbiology.168: 536-546.

Salli K.M., Forssten S.D., Lahtinen S.J., Ouwehand A.C. (2016). Influence of sucrose and xylitol on an early *Streptococcus mutans* biofilm in a dental simulator. Archives of Oral Biology. 70: 39-46.

Scazzocchio F., Garzoli S., Conti C., Leone C., Renaioli C., Pepi F., Angiolella L. (2016). Properties and limits of some essential oils: chemical characterisation, antimicrobial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity. Natural Product Research. 30: 1909-1918.

Semeniuc C.A., Pop C.R., Rotar A.M. (2017). Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Journal of Food and Drug Analysis. 25: 403-408.

Sethi S., Maloney J., Grove L., Wrona C., Berenson C.S. (2006). Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 173: 991-998.

Sharma G., Raturi K., Dang S., Gupta S., Gabrani R. (2017). Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Herbal Medicine. 9: 68-73.

Sheikh S.O., Fasih N., Irfan S., Zafar A. (2014). β-Lactamase production and antimicrobial susceptibility pattern of *Moraxella catarrhalis* isolates: report from Pakistan. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 7: 228-231.

Sherry E., Reynolds M., Sivananthan S., Mainawalala S., Warnke P.H. (2004). Inhalational phytochemicals as possible treatment for pulmonary tuberculosis: two case reports. Americal Journal of Infection Control. 32(6): 369-70.

Sienkiewicz M., Kowalczyk E., Wasiela M. (2012). Recent patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. 7: 133-140.

Silva V.A., Pereira da Sousa J., de Luna Freire Pessôa H., Ramos de Freitas A.F., Coutinho D.M.H., Beuttenmuller Nogueira Alves L., Oliveira Lima E. (2016). *Ocimum basilicum*: antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. Pharmacetical Biology. 54: 863-867.

Skandamis P.N., Nychas G.J.E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. Journal of Applied Microbiology. 91: 1011-1022.

Stecchini M.L., Sarais I., Giavedoni P. (1993). Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. Journal of Food Protection. 56(5): 406-409.

Steer A.C., Carapetis J.R., Dale J.D., Fraser J.D., Good M.F., Guilhermeg L., Morelandh N.J., Mulholland E.K., Schodel F., Smeesters P.R**.** (2016). Status of research and development of vaccines for *Streptococcus pyogenes*. Vaccine. 34: 2953-2958.

Suliman S., Van Vuuren S.F., Viljoen A.M. (2010). Validating the *in vitro* antimicrobial activity of *Artemisia afra* in polyherbal combinations to treat respiratory infections. South African Journal of Botany. 76: 655-661.

Tanaka Y., Kikuzaki H., Nakatani N. (2002). Antibacterial activity of essential oils and oleoresins of spices and herbs against pathogens bacteria in upper airway respiratory tract. Japanese Journal of Food Chemistry. 9(2): 67-76.

Tisserand R., Young R. (2014). Essential Oil Safety - A guide for health care professionals, Second Edition. Tisserand R., Young R. (Eds.). Elsevier. London. 99-110, 187-482.

Tiwari B.K., Valdramidis V.K., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57: 5987-6000.

Tserennadmid R., Takó M., Galgóczy L., Papp T., Pesti M., Vágvölgyi Cs., Almássy K., Krisch J. (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. International Journal of Food Microbiology. 144: 480-486.

Tsigarida E., Skandamis P., Nychas G.J.E. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 degrees C. Journal of Applied Microbiology. 89: 901-909.

Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(6): 2474-2478.

Tullio V., Nostro A., Mandras N., Dugo P., Banche G., Cannatelli M.A., Cuffini A.M., Alonzo V., Carlone N.A. (2007). Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapor contact methods. Journal of Applied Microbiology. 102: 1544-1550.

Tyagi A.K., Malik A. (2011a). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapor phase against food spoilage microorganisms. Food Chemistry. 126: 228-235.

Tyagi A.K, Malik A. (2011b). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapor phase against food spoiling microorganisms. Food Control. 22: 1707-1714.

Tyihák E., Mincsovics E., Kalász H. (1979). New planar liquid chromatographic technique: overpressured thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A. 174: 75-81.

Usachev E.V., Pyankov O.V., .Usacheva O.V., Agranovski I.E. (2013). Antiviral activity of tea tree and eucalyptus oil aerosol and vapour. Journal of Aerosol Science. 59: 22-30.

Vail W.B., Vail M.L. (2006). United States Patent: Methods and apparatus to prevent, treat and cure infections of the human respiratory system by pathogens causing severe acute respiratory syndrome (SARS). US 20067048953.

Valcourt C., Saulnier P., Umerska A., Zanelli M.P., Montagu A., Rossines E., Joly-Guillou M.L. (2016). Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against Gram-negative bacteria. Interantional Journal of Pharmaceutics. 498: 23-31.

Valente C., Hinds J., Gould K.A., Pinto F.R., de Lencastre H., Sá-Leão R**.** (2016). Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Streptococcus pneumoniae* multiple serotype carriage. Vaccine. 34(34):4072-4078.

Valero M., **Francẻs E**. (2006). Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. Food Microbiology. 23: 68-73.

Van Vuuren S.F., Viljoen A.M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. Flavour and Fragrance Journal. 22: 540-544.

Végh A., Bencsik T., Molnár P., Böszörményi A., Lemberkovics É., Kovács K., Kocsis B., Horváth Gy. (2012). Composition and antipseudomonal effect of essential oils isolated from different lavender species. Natural Product Communication. 7: 1393-1396.

Vilela G.R., Almeida G.S., D'Arce M.A.B.R., Moraes M.H.D., Brito J.O., Silva M.F.G.F., Silva S.C., Piedade S.M., Calori-Domingues M.A., Micotti da Gloria E. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. Journal of Stored Products Research. 45: 108-111.

Viljoen A.M., Van Vuuren S.F., Gwebu T., Demirci B., Baser K.H.C. (2006). The geographical variation and antimicrobial activity of African wormwood (*Artemisia afra* Jacq.) essential oil. Journal of Essential Oil Research. 18: 19-25.

Wagner H., **Ulrich-Merzenich G.** (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine. 16: 97-110.

Wajima T., Seyama S., Nakamura Y., Kashima C., Nakaminami H., Ushio M., Fujii T., Noguchi N. (2016). Prevalence of macrolide-non-susceptible isolates among β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in a tertiary care hospital in Japan. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 6: 22-26.

Wright C.W. (2002). Artemisia. Wright C.W (Ed.). Taylor & Francis. London, New York. 1-78, 149-158.

World Health Organization (WHO, 2015). The top 10 causes of death. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/ [letöltve: 2017.12.11]

Ye H., Shen S., Xu J., Lin S., Yuan Y., Jones G.S. (2013). Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. Food Control. 34: 619-623

Zhang Y., Niu Y., Luo Y., Ge M., Yang T., Yu L., Wang Q. (2014). Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. Food Chemistry. 142: 269-27.

8. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

8.1 Az értekezés alapját képező publikációk

Horváth Gy., **Ács K.**, Kocsis B. (2013). TLC-Direct bioautography for determination of antibacterial activity of *Artemisia adamsii* essential oil. Journal of AOAC International 96 (6): 1209-1213. IF: 1,385

Ács K., Bencsik T., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2016). Essential oils and their vapors as potential antibacterial agents against respiratory tract pathogens. Natural Product Communications. 11(11):1709-1712. IF: 0,773

Ács K., Balázs V.L., Kocsis B., Bencsik T., Böszörményi A., Horváth Gy. (2018). Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens.
Közlésre benyújtva

8.2 Egyéb publikációk

Horváth Gy., **Ács** K. (2015). Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in infections: a review. Flavour and Fragrance Journal. 30: 331-341. IF: 1,693

Ács K., Bencsik T., Horváth Gy. (2016). Illóolajok szerepe a légúti megbetegedések alternatív terápiájában. Gyógyszerészet. 60: 280-288. IF:-

Ács K., Kocsis B., Balázs V.L., Kerekes E., Csikós E., Varga A., Krisch J., Vágvölgyi Cs., Horváth Gy. (2018). Illóolajok, illóolaj-komponensek és antibiotikumok együttes alkalmazásának lehetőségei légúti infekciók esetén. Gyógyszerészet. In press. Közlésre elfogadva. IF:-

Ács K. (2017). A kamilla és illóolajának gyógyászati alkalmazása. Aromatika magazin. 4(1): 6-9. IF:-

Ács K. (2017). A borsosmenta illóolajának gyógyászati alkalmazása. Aromatika magazin. 4(4): 26-29. IF:-

Horváth Gy., Farkas Á., Papp N., Bencsik T., **Ács K.**, Gyergyák K., Kocsis B. (2016): Chapter 3 - Natural Substances from Higher Plants as Potential Anti-MRSA Agents. In: Atta-ur-Rahman (szerk.). Studies in Natural Products Chemistry. Amszterdam. Elsevier. 47: 63-110.

Horváth Gy., Bencsik T., **Ács K.,** Kocsis B. (2016). Chapter 12 - Sensitivity of ESBL-producing Gram-negative bacteria to essential oils, plant extracts, and their isolated compounds In: Kon K., Rai M. (szerk.). Antibiotic Resistance. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. San Diego: Academic Press. 239-269.

8.3 Konferencia absztraktok

8.3.1 Konferencia előadások absztraktja

Ács K., Böszörményi A., Lemberkovics É., Vágvölgyi Cs., Galgóczy L., Tserennadmid R., Krisch J., Kocsis B., Horváth Gy. (2013). Phytochemical characterisation and microbiological evaluation of a mongolian medicinal plant (*Artemisia adamsii* Besser). 10th János Szentágothai Transdisciplinary Conference and Student Competition. Pécs.

Ács K., Böszörményi A., Lemberkovics É. Kocsis B., Vágvölgyi Cs., Galgóczy L., Krisch J., Tserennadmid R., Horváth Gy. (2014). Egy mongol gyógynövény (*Artemisia adamsii* Besser) fitokémiai és mikrobiológiai jellemzése. Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma. Budakalász.

Ács K., Bencsik T., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2014). Illóolajok antimikrobás hatásának vizsgálata multidrog-rezisztens baktériumtörzseken. Cholnoky László Szakkollégium Nyitónap. Pécs.

Ács K., Bencsik T., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2014). Illóolajok antimikrobás hatásának vizsgálata multidrog-rezisztens baktériumtörzseken. A Magyar Biológiai Társaság Botanikai Szakosztálya és a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának közös előadóülése. Budapest. Botanikai Közlemények. 101(1-2): 291-292.

Ács K., Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2015). Antibacterial evaluation of some essential oils with vapour-phase technique. 4th Interdisciplinary Doctoral Conference. Pécs.

Ács K., Balázs L.V., Kocsis B., Böszörményi A., Schneider Gy., Móricz Á., Ott P.G., Horváth Gy.: TLC-bioautography: an appropriate test for detection of antibacterial activity of essential oils. 40th Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds. Katowice-Szczyrk.

Ács K., Balázs L.V., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2017). A fahéj- és a szegfűszeg illóolaj antimikrobás hatásának vizsgálata rezisztens baktériumtörzseken. DKK17-Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban Konferencia. Pécs.

8.3.2 Poszter prezentációk absztraktjai

Ács K., Molnár P., Böszörményi A., Lemberkovics É., Vágvölgyi Cs., Galgóczy L., Krisch J., Tserennadmid R., Horváth Gy.: Adatok egy mongol gyógynövény (*Artemisia adamsii* Besser) fitokémiai jellemzéséhez. XII. Magyar Gyógynövény Konferencia. Szeged. Gyógyszerészet Supplementum 55: S23.

Ács K., Molnár P., Böszörményi A., Lemberkovics É., Vágvölgyi Cs., Galgóczy L., Tserennadmid R., Krisch J., Horváth Gy. (2013). Phytochemical characterisation of a mongolian medicinal plant (*Artemisia adamsii* Besser). 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences. Pécs.

Ács K., Böszörményi A., Lemberkovics É., Kocsis B., Vágvölgyi Cs., Galgóczy L., Krisch J., Tserennadmid R., Horváth Gy. (2014). Egy mongol gyógynövény (*Artemisia adamsii* Besser) illóolajának fitokémiai és mikrobiológiai értékelése. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV. Budapest. Gyógyszerészet Supplementum. 4: S80.

Horváth Gy., Jesionek W., **Ács K.**, Böszörményi A., Lemberkovics É., Kocsis B. (2014). TLC-Bioautography as an appropriate tool for detection of antibacterial activity of essential oils. 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products. Lublin.

Ács K., Bencsik T., Kocsis B., Horváth Gy. (2014). *In vitro* antibacterial activity of essential oils against multidrug-resistant strains. 45th International Symposium on Essential Oils. Isztambul. Natural Volatiles & Essential Oils. Special Issue. 1: 162.

Horváth Gy., Jesionek W., **Ács K.**, Böszörményi A., Lemberkovics É., Kocsis B (2014). TLC-bioautográfia: a rétegkromatográfia szerepe illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálatában. Elválasztástudományi Vándorgyűlés. Egerszalók.

Ács K., Kulcsár K., Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2015). Vapour-phase method: a possible solution for *in vitro* antimicrobial evaluation of volatile substances. 46th International Symposium on Essential Oils. Lublin. Natural Volatiles & Essential Oils. Special Issue. 2(3): 54.

Horváth Gy., **Ács K**., Jesionek W., Choma I., Böszörményi A., Kocsis B. (2015). Role of thin layer chromatography in detection of antibacterial activity of essential oils. International Congress and Annual Meeting of Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Budapest. Planta Medica: Natural Products and Medicinal Plant Research. 81: 1549.

Ács K. ,Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2016). Essential oil vapors as potential agents against *Haemophilus* species. 47th International Symposium On Essential Oils, Nice, p.45.

Reza Ashraf A., Csikós E., **Ács K**. Böszörményi A., Kereskai L., Kocsis B., Kemény Á., Csekő K., Helyes Zs., Horváth Gy. (2016). Thyme essential oil inhalation decreases endotoxin-induced acute airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. 47th International Symposium On Essential Oils, Nice, p.48.

Csikós E., Reza Ashraf A., **Ács K**. Böszörményi A., Kereskai L., Kocsis B., Kemény Á., Csekő K., Helyes Zs., Horváth Gy. (2016). Effect of cinnamon and citronella essential oil in endotoxin-evoked acute airway inflammation mouse model. 47th International Symposium On Essential Oils, Nice, p.63.

Balázs V.L., **Ács K.,** Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2017). Antibacterial evaluation of clove, peppermint and thyme essential oil against Haemophilus species. 48th International Symposium On Essential Oils. Natural Volatiles & Essential Oils Special Issue. 4(3): 141, P-68

Balázs V.L., **Ács K**. Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2017). Antibacterial effect of cinnamon bark, clove, thyme and peppermint oil against respiratory tract pathogens. 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences. Balatonfüred. Acta Pharmaceutica Hungarica. 87:(3-4) p. 173.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet témavezetőmnek Dr. Horváth Györgyi egyetemi docensnek, aki munkám szakmai támogatását töretlen lelkesedéssel és odaadással végezte. Külön köszönöm Dr. Kocsis Bélának és Dr. Kocsis Bélánénak, hogy a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében a mikrobiológiai vizsgálatok kidolgozásában, optimalizálásában és megvalósításában elengedhetetlen segítséget és iránymutatást nyújtottak számomra és lehetővé tették azok megvalósulását. Hálásan köszönöm Dr. Böszörményi Andreának a gázkromatográfiás analízisek kivitelezésében és értékelésében nyújtott segítségét, amellyel disszertációm szakmai szempontból történő gazdagítását tette lehetővé. Kiemelt köszönet illeti Dr. Kerekes Erikát az SZTE TTIK Mikrobiológiai Intézetéből a checkerboard vizsgálatok betanításakor tanusított végtelen türelméért, valamint azok kivitelezésében nyújtott hatalmas segítségért. Ezúton köszönöm Farkas Richárdnak a PTE Közgazdaságtan és Ökonometria Intézetéből a statisztikai analízisek kivitelezését és értékelését. Köszönettel tartozom ezen felül, Dr. Tserennadmid Rentsenkhandnak az *A. adamsii* Besser azonosításáért, valamint begyűjtéséért, továbbá a lehetőségért, hogy módomban állt megvizsgálni ezt az eddig kevésbé kutatott gyógynövényt. Ezúton fejezem ki hálám batátomnak és kollégámnak Balázs Viktória Lillának, aki a kölcsönhatás vizsgálatok értékelése során nélkülözhetetlen segítségemre volt. Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Deli Józsefnek a PTE GYTK Farmakognóziai Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette munkám sikeres kimenetelét az intézetben, valamint minden kollégámnak, aki hozzájárult vizsgálataim megvalósulásához. Külön köszönet illeti Dr. Bencsik Tímeát, aki amelett, hogy segítségemre volt a mikrobiológiai módszerek megismerésének és elsajátításának egy részében, hasznos észrevételeivel a dolgozat alapjául szolgáló műveket is mindig jó szándékú javaslatokkal és építő kritikákkal látta el.

Ezen felül szeretném megköszönni kedves barátaim és szerető családom kiemelkedő támogatását és mérhetelen türelmét, az ő inspirációjuk és bátorításuk nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

A PhD dolgozatban bemutatott kutatási tevékenység anyagi támogatásáért köszönet illeti az Astellas Pharma Kft.- Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Ifjú Kutató Programját.

10. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Illóolajok és antimikrobás szerek kölcsönhatásának értékelése légúti patogének esetén az eddig publikált vizsgálatok tükrében.

1.1. táblázat

Illóolaj	Antimikrobás szer	Légúti patogén	Kölcsönhatás	Ref.
Acanthospermum hispidum DC.	Gentamicin, Oxacillin	*S. aureus*	Szinergista	Alva et al. 2012
Cymbopogon citratus DC.	Natamicin	*A. niger*	Additív	Ben-Fadhel et al. 2017
Cinnamomum verum J.Presl.	Amikacin, Gentamicin	*A. baumannii*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Imipenem, Meropenem	*A. baumannii*	Additív	
	Natamicin	*A. niger*	Additív	Ben-Fadhel et al. 2017
Cinnamomum sp.	Tobramicin	*S. aureus, S. pneumoniae, Moraxella* spp.	Szinergista/ Additív	Bassyouni et al. 2016
		A. baumannii, Pseudomonas spp., *K. pneumoniae*	Additív/ Antagonista	
Citrus limon (L.) Osbeck	Amikacin, Gentamicin	*A. baumannii*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Imipenem, Meropenem		Additív	
Coriandrum sativum L.	Cefoperazon, Piperacillin	*A. baumannii*	Additív	
	Klóramfenikol, Ciprofloxacin, Tetraciklin	*A. baumannii*	Szinergista	
	Gentamicin	*S. aureus, A. baumannii*	Szinergista	Langeveld et al. 2014, Scazzoc-chio et al. 2016
		K. pneumoniae	Szinergista/Additív	Scazzocchio et al. 2016
Eucalyptus camaldulensis Dehnh.	Ciprofloxacin, Gentamicin	multidrog-rezisztens *A. baumannii*	Additív	Knezevic et al. 2016
Eugenia jambolana Lam.	Amikacin, Eritromicin	*S. aureus*	Additív	Pereira et al. 2017
		P. aeruginosa	Szinergista	
	Gentamicin	*S. aureus, P. aeruginosa*	Additív	
Helichrysum italicum G. Don	Klóramfenikol	*A. baumanii, P. aeruginosa*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
Lantana montevidensis (Spreng.) Briq.	Amikacin, Neomicin, Gentamicin, Kanamicin	*S. aureus*	Szinergista	De Sousa et al. 2013
Lippia sidoides Cham.	Amikacin, Gentamicin, Neomicin	*S. aureus, P. aeruginosa*	Szinergista/Additív	Langeveld et al. 2014
Melaleuca alternifolia Cheel.	Ciprofloxacin	*S. aureus*	Antagonista	
		K. pneumoniae	Additív/ Antagonista	
	Gentamicin	*A. baumannii, S. aureus*	Szinergista	Langeveld et al. 2014, Scazzoc-chio et al. 2016
		K. pneumoniae	Szinergista/Additív	Scazzocchio et al. 2016

1. melléklet: (folytatás)

Illóolaj	Antimikrobás szer	Légúti patogén	Kölcsönhatás	Ref.
Melaleuca alternifolia Cheel.	Tobramicin	*S. aureus*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Vankomicin		Additív	
Mentha suaveolens Ehrh.	Gentamicin	*S. aureus*	Additív	Scazzocchio et al. 2016
		K. pneumoniae	Szinergista/ Additív	
Mentha piperita L.	Ciprofloxacin	*S. aureus, K. pneumoniae*	Additív	Langeveld et al. 2014
Myrtus communis L.	Polimixin B, Ciprofloxacin	*A. baumannii*	Szinergista	Aleksic et al. 2014
Origanum vulgare L.	Gentamicin	*A. baumannii, S. aureus*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
Ocimum basilicum L.	Imipenem	*S. aureus*	Szinergista	Silva et al. 2016
	Imipenem, Ciprofloxacin	*P. aeruginosa*	Szinergista/Additív	
	Ciprofloxacin	*S. aureus*	Antagonista	
Pelargonium graveolens L'Hér.	Ciprofloxacin	*S. aureus, K. pneumoniae*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Norfloxacin	*S. aureus*		
Peucedanum officinale L.	Tetraciklin, Streptomycin Klóramfenikol,	*K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. aureus*	Szinergista/Additív	Miladinović et al. 2015b
Pistacia lentiscus L.	Ofloxacin	*A. baumannii*	Szinergista	Lahmar et al. 2017
	Amoxicillin, Piperacillin, Oxacillin, Tetraciklin	*S. aureus*		
Pituranthos chloranthus (Coss. & Durieu) Schinz	Amoxacillin, Ofloxacin, Pipercillin, Oxacillin, Tetraciklin	*S. aureus*	Szinergista	
	Ofloxacin, Tetraciklin	*A. baumannii*	Szinergista	
Rosmarinus officinalis L.	Ciprofloxacin	*S. aureus, K. pneumoniae*	Szinergista/ Additív	Langeveld et al. 2014
Satureja montana L.	Natamicin	*A. niger*	Additív	Ben-Fadhel et al. 2017
Syzygium aromaticum (L.) Merrill & Perry	Ampicillin, Gentamicin	*S. mutans, S. gordonii, S. sobrinus*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
Teucrium ramosissimum Desf.	Ofloxacin	*A. baumannii*	Szinergista	Lahmar et al. 2017
	Ofloxacin, Piperacillin, Tetraciklin, Oxacillin	*S. aureus*		
Thymus broussonetii Boiss.	Ciprofloxacin, Cefixim, Gentamicin	*K. pneumoniae*	Additív	Langeveld et al. 2014
		P. aeruginosa	Szinergista	
	Ciprofloxacin, Cefixim, Gentamicin, Pristinamycin	*S. aureus*	Szinergista	
	Pristinamycin	*K. pneumoniae*	Szinergista	
		P. aeruginosa	Additív	
Thymus glabrescens Willd.	Klóramfenikol	*K. pneumoniae, P. aeruginosa*	Szinergista/ Additív	Ilić et al. 2014
	Klóramfenikol	*S. aureus*	Additív/ Antagonista	
	Tetraciklin	*K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. aureus*	Additív	Miladinović et al. 2015a

1. melléklet: (folytatás)

Illóolaj	Antimikrobás szer	Légúti patogén	Kölcsönhatás	Ref.
Thymus magnus Nakai	Norfloxacin	*S. aureus*	Szinergista/ Additív	Langeveld et al. 2014
Thymus maroccanus Ball.	Ciprofloxacin, Gentamicin	*K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. aureus*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Cefixim	*K. pneumoniae, P. aeruginosa*	Additív	
		S. aureus	Szinergista	
	Pristinamycin	*K. pneumoniae*	Szinergista	
		P. aeruginosa, S. aureus	Additív	
Thymus numidicus Poir.	Imipenem,	*S. aureus*	Antagonista	Adrar et al. 2016
	Cefotaxim	*S. aureus*	Nincs kölcsönhatás	
	Ciprofloxacin		Additív	
Thymus quinquecostatus Celak	Norfloxacin	*S. aureus*	Szinergista/ Additív	Langeveld et al. 2014
Thymus vulgaris L.	Ciprofloxacin	*S. aureus*	Additív	
Zataria multiflora Boiss.	Vankomicin	meticillin-rezisztens *S. aureus,* meticillin - érzékeny *S. aureus*	Szinergista	
Zingiber cassumunar Roxb.	Amoxicillin, Piperacillin-tazobaktám, Amoxicillin-klavulánsav, Ceftazidim, Cefepim, Cefotaxim, Ceftriaxon, Imipenem, Meropenem, Ertapenem,	rezisztens *A. baumannii*	Additív	Boonyan-ugomol et al, 2017
	Gentamicin, Amikacin, Doxiciklin, Tetraciklin, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Trimetoprim-szulfametoxazol		Szinergista	

2. melléklet: Illóolaj-komponensek és antimikrobás szerek kölcsönhatásának értékelése légúti patogének esetén az eddig publikált vizsgálatok tükrében

2.1. táblázat

Illóolaj-komponens	Antimikrobás szer	Légúti patogén	Kölcsönhatás	Ref.
Bergamottin/ Kumarin-epoxid	Norfloxacin	MRSA	Szinergista	Langeveld et al. 2014
Citrál	Norfloxacin, Penicillin; Tetraciklin,	MRSA	Szinergista/Additív	Gupta et al. 2017
	Eritromicin, Streptomicin		Szinergista	
Citronellol	Gentamicin, Vankomicin, Linezolid, Levofloxacin	MRSA	Szinergista	Albano et al. 2016
p-cymene	Tetraciklin	*S. aureus, S. mutans,*	Szinergista	Miladi et al. 2017
Eugenol	Ampicillin, Gentamicin	*Streptococcus gordonii, S. mutans, S. sobrinus,*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Ampicillin Bacitracin	*S. aureus*	Additív	
	Penicillin	*P. aeruginosa, S. aureus*	Szinergista	
	Eritromicin	*P. aeruginosa*	Szinergista	
		S. pyogenes	Additív	
	Ampicillin, Norfloxacin, Klóramfenikol, Oxacillin, Polimixin B, Rifampicin, Tetraciklin, Vankomicin	*P. aeruginosa*	Szinergista	
	Gentamicin, Vankomicin, Linezolid	MRSA	Szinergista	Albano et al. 2016
	Tetraciklin	*S. aureus, S. mutans,*	Szinergista	Miladi et al. 2017
transz-fahéjaldehid	Ampicillin, Bacitracin	*S. aureus*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Eritromicin	*S. pyogenes*	Additív	
cisz-fahéjsav	Rifampicin	*Mycobacterium tuberculosis*	Szinergista	
transz-fahéjsav	Amikacin, Ampicillin Ciprofloxacin	*S. aureus, P. aeruginosa*	Szinergista	
	Eritromicin, Vankomicin	*P. aeruginosa*	Additív	
		S. aureus	Szinergista	
	Rifampicin	*M. tuberculosis*	Szinergista	
Geraniol	Klóramfenikol	*Klebsiella. pneumoniae, P. aeruginosa*	Szinergista/ Additív	Ilić et al. 2014
		S. aureus	Additív/ Antagonista	
	Penicillin	*S. aureus*	Additív	Langeveld et al. 2014
	Tetraciklin	*K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. aureus*	Additív	Miladinović et al. 2015a
Karvakrol	Ampicillin, Bacitracin, Penicillin	*S. aureus*	Szinergista	Langeveld et al. 2014

2. melléklet: (folytatás)

Illóolaj-komponens	Antimikrobás szer	Légúti patogén	Kölcsönhatás	Ref.
Karvakrol	Eritromicin	*S. pyogenes*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Tetraciklin	*S. aureus, S. mutans,*	Szinergista	Miladi et al. 2017
Timol	Penicillin	*S. aureus*	Additív	Langeveld et al. 2014
	Amikacin	*S. aureus*	Szinergista/ Additív	
	Amikacin	*P. aeruginosa*	Additív	
	Ampicillin, Bacitracin	*S. aureus*	Szinergista	
	Cefotaxim	*S. aureus*	Nincs kölcsönhatás	Adrar et al. 2016
	Imipenem		Antagonista	
	Klóramfenikol	*K. pneumoniae, P. aeruginosa*	Szinergista/ Additív	Ilić et al. 2014
		S. aureus	Antagonista	
	Eritromicin	*S. pyogenes*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Gentamicin, Neomicin	*S. aureus*	Szinergista/ Additív	
		P. aeruginosa	Additív	
	Natamicin	*Aspergillus niger*	Additív	Ben-Fadhel et al. 2017
	Norfloxacin, Penicillin	*S. aureus*	Szinergista	Langeveld et al. 2014
	Tetraciklin	*K. pneumoniae, P. aeruginosa,*	Additív	Ben-Fadhel et al. 2017
		S. mutans, S. aureus	Szinergista	Miladi et al. 2017
γ-terpinén	Tetraciklin	*S. aureus, S. mutans,*	Szinergista	
Terpineol	Gentamicin, Linezolid, Levofloxacin	MRSA	Szinergista	Albano et al. 2016
Eugenol + karvakrol + *transz*-fahéjaldehid	Doxiciklin	*P. aeruginosa, Acinetobacter. baumannii*, *K. pneumoniae*	Additív	Valcourt et al. 2016

3. melléklet: A disszertációban vizsgált Aromax illóolajok adatai

Az sHS-SPME, vapour phase valamint csőhígítás módszeréhez felhasznált illóolajok gyártási számai:

Fahéjolaj:	A6302/0909,
Szegfűszegolaj:	E0971/1211
Kakukkfűolaj:	E8392/1308
Borsmentaolaj:	E7421/1307
Citronellaolaj:	E8912/1308, G3531/1407
Eredeifenyő olaj	G3032/1406
Eukaliptuszolaj	C6571/1110, G1452/1404

A direkt bioautográfiás módszerekhez valamint checkerboard-titráláshoz felhasznált illóolajok gyártási számai:

Fahéjolaj:	H0052/1506
Szegfűszegolaj:	H6121/1512
Kakukkfűolaj:	H7781/1602
Borsmentaolaj:	H5291/1511
Citronellaolaj:	H8131/1601
Eredeifenyő olaj	H7091/1601
Eukaliptuszolaj	G8921/1501

4. melléklet: A csőhígítás és vapour phase vizsgálatok során felhasznált illóolajok GC analízise (2. sarzs)

4.1. táblázat

Komponensek	Retenciós idők (min)		Komponensek mennyisége (FID, %)	
	MS	FID	Citronellaolaj	Eukaliptuszolaj
α-pinén	5,9	5,8	-	0,8
β-pinén	6,9	6,7	-	0,3
p-cimol	7,9	7,6	-	6,4
limonén	8,0	7,5	4,6	7,0
1,8-cineol	8,1	7,9	-	**85,0**
nerál	10,3	10,2	0.9	-
citronellál	10,5	11,0	**32,8**	-
geranial	10,7	11,2	1,3	-
citronellol	11,9	12,9	13,7	-
geraniol	12,4	13,4	24,6	-
citronellil-acetát	14,1	14,1	3,1	-
geranil-acetát	14,5	14,2	2,6	-
β-elemén	14,9	14,7	4,0	-
β-kubebén	16,4	15,8	0,7	-
β-kadinén	17,0	16,0	2,2	-
elemol	17,4	16,4	3,2	-
eudesmol	19,1	18,3	2,8	-
Összesen (%):			**96,5**	**99,5**

5. melléklet: A direkt bioautográfia és checkerboard-titrálás során felhasznált illóolajok GC analízise (kombinációs vizsgálatokhoz)

5.1. táblázat

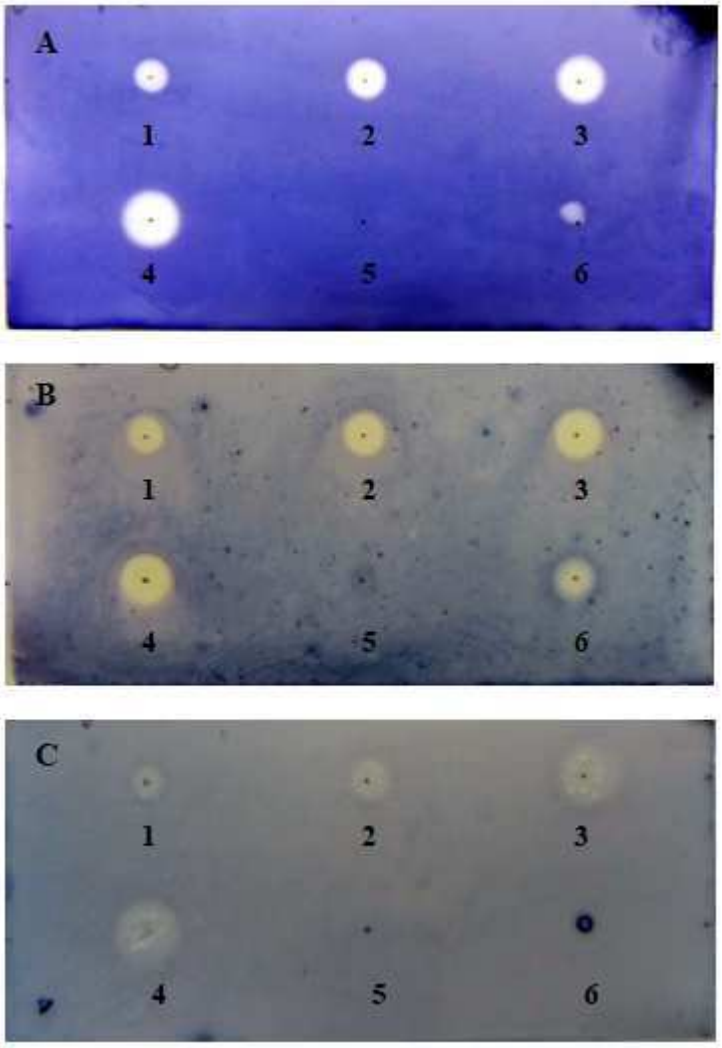
Komponensek	Retenciós idők (min)		Komponensek mennyisége (FID, %)						
	MS	FID	1	2	3	4	5	6	7
α-pinén	5,1	7,2	2,0	**34,5**	0,9	0,7	0,9	-	-
kamfén	5,5	7,5	-	0,9	-	1,5		-	-
β-fellandrén	6,0	8,0	-	-	-	-	0,4	-	-
β-pinén	6,1	8,2	0,3	13,3	-	0,2	1,1	-	-
β-mircén	6,3	8,3	0,7	1,1	-	1,2	-	-	-
3-karén	6,8	8,8	-	8,5	-	-	-	-	-
α-fellandrén	6,7	8,7	0,7	-	-	-	-	-	-
α-terpinén	7,0	9,0		0,2	-	2,0	-	-	-
p-cimol	7,2	9,1	3,2	1,4	1,4	19,5	-	-	-
limonén	7,3	9,3	7,6	15,0	1,9	-	2,3	3,9	-
verbenol	9,1	9,3	-	0,6	-	-	-	-	-
1,8-cineol	7,4	9,4	**82,1**	-	2,6	0,5	6,7	-	-
γ-terpinén	7,9	9,8	3,2	-	-	5,6	-	-	-
terpinolén	8,6	10,4	-	-	-	0,3	-	-	-
linalool	8,8	10,5	-	-	4,0	5,4	-	0,5	-
fenkol	9,3	11,1	-	0,3	-	-	-	-	-
1-terpineol	9,6	11,4	-	0,9	-	-	-	-	-
izopulegol	10,0	11,6	-	-	-	-	1,6	-	-
β-terpineol	9,9	11,7	-	0,9	-	-	-	-	-
citronellál	10,0	11,7	-	-	-	-		**39,2**	-
mentone	10,1	11,8	-	-	-	-	16,6	-	-
izoborneol	10,3	12,0	-	0,1	-	0,4	-	0,3	-
izomentone	10,3	12,1	-	-	-	-	8,0	-	-
izomentol	10,4	12,2	-	-	-	-	4,4	-	-
borneol	10,4	12,2	-	0,4	-	0,7	-	-	-
mentol	10,6	12,3	-	-	-	-	**48,3**	-	-
terpinén-4-ol	10,6	12,3	-	-	-	0,8	-	-	-
neomentol	10,8	12,5	-	-	-	-	1,0	-	-
α-terpineol	10,9	12,6	-	6,2	1,6	0,7	-	-	-
γ-terpineol	11,0	12,7	-	0,5	-	0,2	-	-	-
β-citronellol	11,5	13,0	-	-	-	-	-	15,7	-
nerál	11,7	13,3	-	-	-	-	-	1,3	-
geraniol	12,0	13,4	-	-	-	-	-	20,8	-
pulegon	11,8	13,4	-	-	-	-	1,5	-	-
anethol	13,1	13,5			2,1				
linalil-acetát	11,9	13,5	-	-	-	0,3	-	-	-
piperiton	12,1	13,7	-	-	-	-	1,2	-	-
geraniál	12,3	13,8	-	-	-	-	-	1,8	-
transz-fahéjaldehid	12,6	14,2	-	-	**75,5**	-	-	-	-
timol	12,9	14,2	-	-	-	**48,2**	-	-	-

5. melléklet: (folytatás)

Komponensek	Retenciós idők (min)		Komponensek mennyisége (FID, %)						
	MS	FID	1	2	3	4	5	6	7
mentil-acetát	12,7	14,3	-	-	-	-	3,1	-	-
karvakrol	13,0	14,4	-	-	-	3,5	-	-	-
verbenon	13,1	14,5	-	0,2		-	-	-	-
citronellil-acetát	13,8	15,2	-	-	-	-	-	2,3	-
bornil-acetát	12,6	15,3	-	3,4	-	-	-	-	-
eugenol	13,9	15,4	-	-	1,5	-	-	0,7	**86,8**
α-kubebén	13,8	15,5	-	0,3	-	-	-	-	-
neril-acetát	14,3	15,6	-	-	-	0,5	-		-
geranil-acetát	14,3	15,7	-	-	-	-	-	3,4	-
α-kopaén	14,4	15,9	-	0,2	-	-	-		-
β-bourbonén	14,5	16,0	-	-	-	-	0,4		-
β-elemén	14,6	16,0	-	-	-	-	-	1,2	-
junipene	15,0	16,5	-	0,9	-	-	-		-
β-kariofillén	15,2	16,6	-	7,7	2,6	3,0	1,1	0,3	9,7
fahéj-acetát	15,5	17,0	-	-	3,9	-	-	-	-
α-humulén	15,8	17,2	-	0,6	-	0,3	-	0,1	2,3
γ-muurolén	16,1	17,5	-	-	-	-	-	0,2	-
β-kubebén	16,2	17,6	-	-	-	-	-	1,3	-
α-muurolén	16,5	17,9	-	-	-	-	0,2	0,4	-
γ-kadinén	16,7	18,1	-	-	-	-	0,2	0,5	-
β-kadinén	16,8	18,2	-	-	-	-	-	1,4	0,2
o-metoxy-fahéjaldehid	17,0	18,3	-	-	-	-	-	-	-
elemol	17,3	18,6	-	-	-	-	-	1,8	-
τ-kadinol	17,8	19,0	-	-	-	-	-	0,7	-
kariofillén-oxid	17,9	19,2	-	1,3	-	0,3	-	-	0,6
γ-eudesmol	18,6	19,9	-	-	-	-	-	0,2	-
τ-muurolol	18,8	20,0	-	-	-		-	0,2	-
α-kadinol	19,0	20,2	-	-	-	-	-	0,8	-
Összesen (%):			**99,8**	**99,4**	**98,0**	**95,8**	**99,0**	**99,0**	**99,6**

1: eukaliptuszolaj, 2: erdeifenyő olaj, 3: fahéjolaj, 4: kakukkfűolaj, 5: borsmentaolaj, 6: citronellaolaj, 7: szegfűszegolaj

6. melléklet: Aromax illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálata direkt bioautográfiás módszerrel

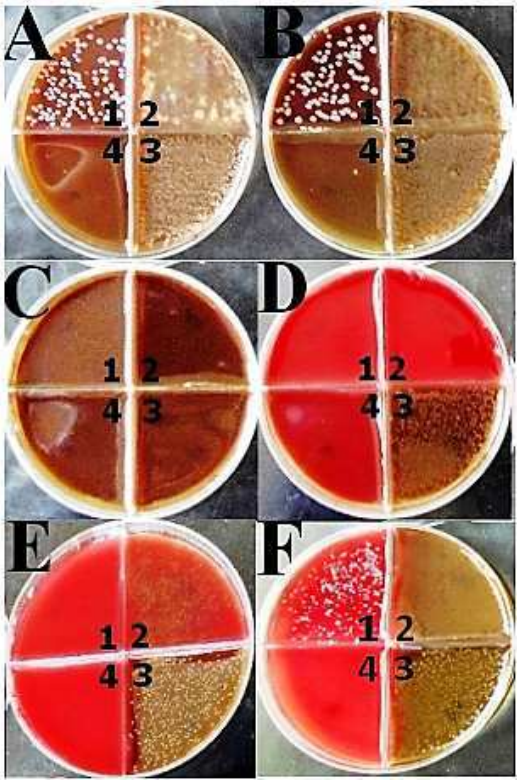


6.1. ábra Aromax illóolajok és antibiotikumok direkt bioautográfiás vizsgálatának eredményei

A: kakukkfű illóolaj (MRSA), **B**: szegfűszeg illóolaj (*P. aeruginosa*),

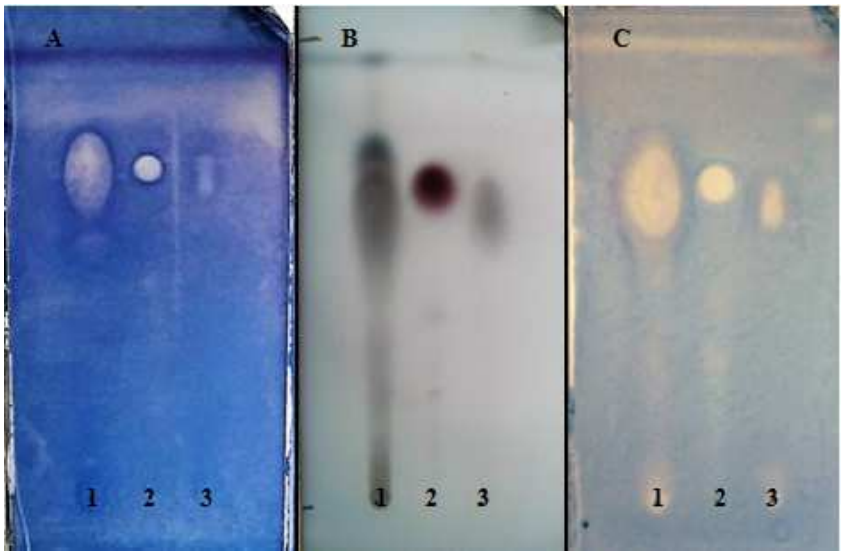
C: fahéjolaj (R-*P. aeruginosa*) **1:** 0,025 mg illóolaj, **2:** 0,05 mg illóolaj, **3:** 0,10 mg illóolaj, **4:** 0,15 mg illóolaj, **5:** abszolút etanol (5 µl). **6:** referencia antibiotikumok: **A:** vankomicin 0,25 µg **B:** ciprofloxacin 0,5 µg, **C:** polimixin B 0,5 µg.

7. melléklet: A kakukkfűolaj gőzterének antimikrobás értékelése vapor phase módszerrel

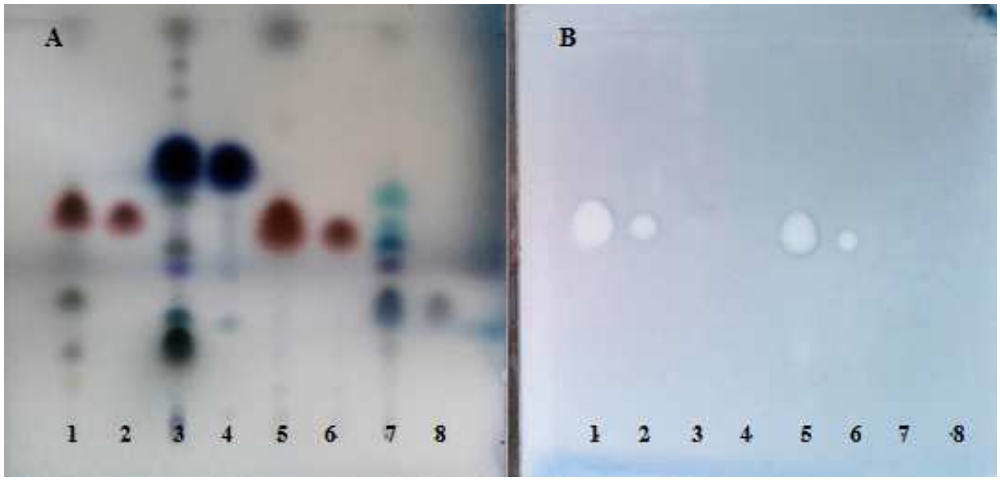


7.1. ábra: A kakukkfűolaj antibakteriális hatásának értékelése vapor phase módszerrel. Kontroll: **A**: a kezeletlen szűrőpapír hatása; **B:** abszolút etanollal kezelt szűrőpapír hatása. Illóolaj koncentrációk: **C:** 125 µl/l ; **D:** 90 µl/l; **E:** 62,5 µl/l; **F:** 31,25 µl/l. A Petri-csésze osztataiban szélesztett baktériumok: **1:** *M. catarrhalis*; **2:** S. *pneumoniae*; **3:** *S. pyogenes*; **4:** kontaminációs kontroll

8. melléklet: Aktív illóolaj-komponensek meghatározása direkt bioautográfiás módszerrel

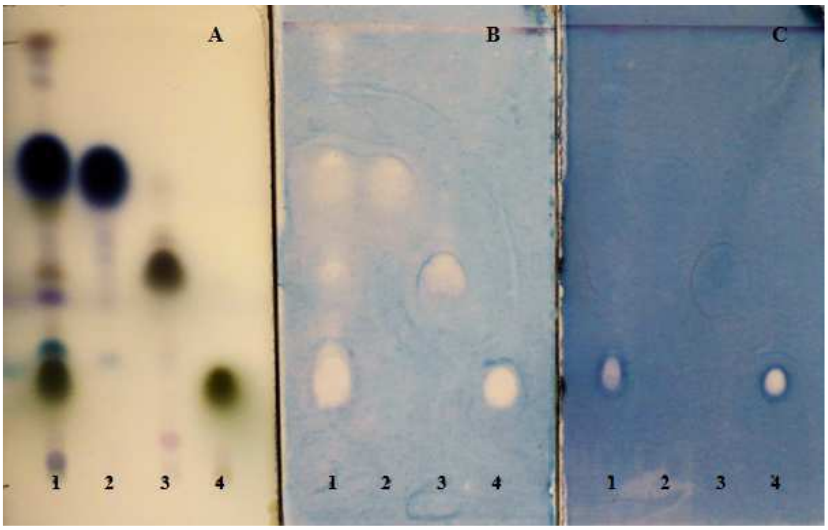


8.1. ábra: Fahéjolaj antibakteriális hatásának vizsgálata MRSA (**A**) és *P. aeruginosa* (**C**) elllen direkt bioautográfiás módszerrel. **A,C:** direkt bioautográfia, **B:** vanillin-kénsavval előhívott réteg. **1:** fahéjolaj, **2:** eugenol, **3:** *transz*-fahéjaldehid



8.2. ábra: Aktív illóolajkomponensek kimutatása R-*P. aeruginosa* elllen direkt bioautográfiás módszerrel. **A:** vanillin-kénsavval előhívott réteg, **B:** direkt bioautográfia. **1:** kakukkfűolaj, **2:** timol, **3:** citronellaolaj, **4:** citronellál, **5:** szegfűszegolaj, **6:** eugenol, **7:** borsmentaolaj, **8:** mentol

8. melléklet: (folytatás)



8.3. ábra: Citronellaolaj antibakteriális hatásának vizsgálata *P. aeruginosa* (**B**) és MRSA (**C**) esetén direkt bioautográfiáás módszerrel. **A:** vanillin-kénsavval előhívott réteg**, B,C:** direkt bioautográfia. **1:** citronellaolaj, **2:** citronellál, **3:** citrál, **4:** gernaiol

9. melléklet: Illóolaj-komponensek kölcsönhatásának statisztikai értékelése Mann-Whitney-Wilcoxon teszttel

9.1. táblázat

Baktériumtörzs	Kombináció	Tesztelt minta	p	W
P. aeruginosa	Mentol-timol	Kombináció mentol	0,01429	16
		Kombináció-timol	0,01429	16
	Mentol-eugenol	Kombináció-mentol	0,01429	16
		Kombináció-eugenol	0,17140	12
	Mentol-*transz*-fahéjaldehid	Kombináció-mentol	0,01429	16
		Kombináció-*transz*-fahéjaldehid	0,34290	10
	Geraniol-timol	Kombináció-timol	0,90000	4
		Kombináció-geraniol	0,01429	16
	Citrál-timol	Kombináció-citrál	0,01429	16
		Kombináció-timol	0,17140	12
	Citronellál-timol	Kombináció-cironellal	0,17140	12
		Kombináció-timol	0,50000	8,5
	Citrál-citronellál	Kombináció-citrál	0,05714	14
		Kombináció-citronellal	0,34290	10
	Geraniol-citrál	Kombináció-geraniol	0,65710	7
		Kombináció-citrál	0,17140	12
	Geraniol-citronellál	Kombináció-geraniol	0,66940	7
		Kombináció-citronellal	0,44290	9
MRSA	Mentol-timol	Kombináció mentol	0,22090	40
		Kombináció-timol	0,00097	62
	Mentol-eugenol	Kombináció-mentol	0,02103	15,5
		Kombináció-eugenol	0,01429	16
	Mentol-*transz*-fahéjaldehid	Kombináció-mentol	0,01429	16
		Kombináció-*transz*-fahéjaldehid	0,01470	16
	Geraniol-timol	Kombináció-timol	0,44290	9
		Kombináció-geraniol	0,02103	15,5
R-*P.aeruginosa*	*Transz*-fahéjaldehid-Timol	Kombináció-*transz*-fahéjaldehid	0,01429	16
		Kombináció-timol	0,01429	16
	Timol-Eugenol	Kombináció-eugenol	0,01429	16
		Kombináció-timol	0,97140	2
	Transz-fahéjaldehid-eugenol	Kombináció-*transz*-fahéjaldehid	0,55710	8
		Kombináció-eugenol	0,24290	11

p: szignifikanciaszint, W: a vizsgált csoport Mann-Whitney-Wilcoxon statisztikája

10. melléklet: A checkerboard-titrálás eredményei

Az alábbi táblázatok a checkerboard-titrálások során kapott mérési eredményeket foglalják össze. A kombinációk FICI értékeit azon kombinációk esetében kerültek kiszámításra, ahol a növekedési százalék kisebb volt, mint 10%. Félkövérrel a szinergista, dőlttel kiemelve az additív kombinációk láthatók.

10.1. táblázat: Timol és mentol kombinációinak FICI értékei

Kombináció, FICI			**Timol**				
Mentol	koncentráció (mg/ml)		**2xMIC**	**MIC**	**MIC/2**	**MIC/4**	**MIC/8**
			6,2	3,1	1,55	0,775	0,3875
	2xMIC	3,1	4,0	-*	-*	-*	-*
	MIC	1,5	-*	-*	-*	-*	-*
	MIC/2	0,775	2,5	-*	-*	-*	-*
	MIC/4	0,3875	2,25	-*	*0,75*	-*	-*
	MIC/8	0,19375	2,13	-*	-*	**0,38**	-*

10.2. táblázat: Eugenol és mentol kombinációinak FICI értékei

Kombináció, FICI			**Mentol**				
Eugenol	koncentráció (mg/ml)		**2xMIC**	**MIC**	**MIC/2**	**MIC/4**	**MIC/8**
			3,1	1,5	0,775	0,3875	0,19375
	2xMIC	12,5	4,0	3,0	2,5	2,25	2,13
	MIC	6,25	3,0	2,0	1,5	1,25	1,13
	MIC/2	3,125	2,5	1,5	1,0	*0,75*	*0,6,*
	MIC/4	1,5625	2,25	1,25	*0,75*	**0,50**	**0,38**
	MIC/8	0,78125	2,13	1,13	*0,63*	-*	-*

10.3. táblázat: Mentol és *transz*-fahéjaldehid kombinációinak FICI értékei

Kombináció, FICI			***transz*-fahéjaldehid**				
Mentol	koncentráció (mg/ml)		**2xMIC**	**MIC**	**MIC/2**	**MIC/4**	**MIC/8**
			1,5	0,78	0,39	0,195	0,0975
	2xMIC	3,1	3,9	3,0	2,5	2,3	-*
	MIC	1,5	2,9	2,0	1,5	-*	-*
	MIC/2	0,775	2,4	1,5	-*	-*	-*
	MIC/4	0,3875	2,2	1,3	-*	-*	-*
	MIC/8	0,19375	2,0	1,1	-*	-*	-*

*- nem került kiszámolásra, a növekedési % > 10

10. melléklet (folytatás)

10.4. táblázat: Timol és geraniol kombinációinak FICI értékei

Kombináció, FICI			Timol				
Geraniol	koncentráció (mg/ml)		**2xMIC**	**MIC**	**MIC/2**	**MIC/4**	**MIC/8**
			6,2	3,1	1,55	0,775	0,3875
	2xMIC	12,5	4,0	3,0	-*	-*	-*
	MIC	6,25	3,0	2,0	1,5	1,25	1,125
	MIC/2	3,125	2,5	1,5	1,0	*0,75*	*0,63*
	MIC/4	1,5625	2,25	1,25	-*	-*	-*
	MIC/8	0,78125	2,125	1,125	-*	-*	-*

10.5. táblázat: Kakukkfű- és borsmentaolaj kombinációinak FICI értékei

Kombináció, FICI			Kakukkfűolaj				
Borsmentaolaj	koncentráció (mg/ml)		**2xMIC**	**MIC**	**MIC/2**	**MIC/4**	**MIC/8**
			6,2	3,1	1,55	0,775	0,3875
	2xMIC	12,5	-*	-*	-*	-*	-*
	MIC	6,25	-*	-*	-*	-*	-*
	MIC/2	3,125	-*	-*	-*	-*	-*
	MIC/4	1,5625	-*	-*	-*	-*	-*
	MIC/8	0,78125	-*	-*	-*	**0,38**	**0,25**

10.6. táblázat: Fahéj- és borsmentaolaj kombinációinak FICI értékei

Kombináció, FICI			Fahéjolaj				
Borsmentaolaj	koncentráció (mg/ml)		**2xMIC**	**MIC**	**MIC/2**	**MIC/4**	**MIC/8**
			6,2	3,1	1,55	0,775	0,3875
	2xMIC	12,5	-*	3,0	2,5	-*	-*
	MIC	6,25	3,0	2,0	1,5	-*	-*
	MIC/2	3,125	-*	1,5	1,0	-*	-*
	MIC/4	1,5625	2,25	1,25	*0,75*	-*	-*
	MIC/8	0,78125	3,64	1,13	*0,63*	-*	-*

10.7. táblázat: Szegfűszeg- és borsmentaolaj kombinációinak FICI értékei

Kombináció, FICI			Borsmentaolaj				
Szegfűszegolaj	koncentráció (mg/ml)		**2xMIC**	**MIC**	**MIC/2**	**MIC/4**	**MIC/8**
			12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78125
	2xMIC	6,25	4,0	-*	-*	2,25	-*
	MIC	3,125	3,0	2,0	1,5	-*	-*
	MIC/2	1,5625	-*	-*	-*	-*	-*
	MIC/4	0,78125	-*	-*	-*	-*	-*
	MIC/8	0,390625	-*	-*	-*	-*	-*

*- nem került kiszámolásra, a növekedési % > 10

SPECIAL GUEST EDITOR SECTION

TLC-Direct Bioautography for Determination of Antibacterial Activity of *Artemisia adamsii* Essential Oil

GYÖRGYI HORVÁTH and KAMILLA ÁCS
University of Pécs, Medical School, Department of Pharmacognosy, Hungary, 7624 Pécs, Rókus u. 2.
BÉLA KOCSIS
University of Pécs, Medical School, Department of Medical Microbiology and Immunology, Hungary, 7624 Pécs, Szigeti út 12

The aim of the present study was the chemical characterization of the essential oil of a Mongolian medicinal plant, *Artemisia adamsii* Besser, and the investigation of the antibacterial effect of its oil on different human pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, and *S. epidermidis*). The chemical composition of the oil was established by GC and GC/MS. Direct bioautography was used for detecting the antibacterial activity of the essential oil. The result of GC experiments showed that α-thujone was the main component (64.4%) of the oil, while the amount of β-thujone was 7.1%. 1,8-Cineole seemed to be the other relevant component (15.2%). The antibacterial activity of the *A. adamsii* essential oil against all three investigated bacteria was observed in the bioautographic system, but this effect was not proportional to the concentrations of α- or β-thujone; therefore, from a microbiological aspect, thujone content does not determine the medicinal value of this oil. On the whole, the combination of TLC separation with biological detection is an appropriate method for evaluating multicomponent and hydrophobic plant extracts, for instance, essential oils, and it provides more reliable results than traditional microbiological methods (e.g., disc diffusion and agar plate techniques).

Many classes of bioactive compounds can be separated by TLC. A special method of detection, direct bioautography (DB), is suitable for studying the antimicrobial activity of plant extracts of natural origin when linked to TLC. Paper chromatography and the microbial detection of antibiotics were combined for the first time in 1946 by Goodall and Levi to determine the purity of penicillin in a mixture (1). Later, other researchers applied TLC plates to detect antibiotic activity (2, 3). DB belongs to a large group of antimicrobial screening methods based on layer separations [TLC, HPTLC, and over pressured layer chromatography (OPLC)]. In the TLC-DB method, a developed TLC plate is dipped in the suspension of microorganisms growing in a suitable broth. The plate is incubated, and microorganisms grow directly on it. For location and visualization of antibacterial substances, tetrazolium salts are usually used, which are converted by the dehydrogenases of living microorganisms to intensely colored formazan (4–8).

The fact of antibiotic resistance contributes to the increase in the number of studies focusing on the application of essential oils as potential, natural antimicrobial agents against plant and human microorganisms (9–12). Essential oils are volatile, hydrophobic substances that are insoluble in water; therefore, the application of common screening methods (e.g., disc diffusion, agar absorption, and agar or broth dilution) may not provide reproducible and reliable experimental results (13). Therefore, there is a need for optimized assays to evaluate the antimicrobial activity of essential oils.

Artemisia adamsii Besser (*Asteraceae*) is a perennial plant native to Mongolia, the Russian Federation, and China. The whole herb of *A. adamsii* has been used as a stomachic agent in Traditional Chinese Medicine for ages (14). While more than 60 *Artemisia* species are used for medicinal purposes, the active compounds of most of the species are still unknown. To date, only a few phytochemical results of this plant have been published. The aerial parts of *A. adamsii* afforded the sesquiterpene arborescin as the main constituent. Bohlmann et al. (15) described 11 new guaianolides, which are constituents of the plant related to arborescin. Only one paper described the essential oil components of *A. adamsii* (16). Therefore, our study was aimed at the phytochemical characterization of the essential oil extracted from *A. adamsii* by GC and GC/MS, and the microbiological evaluation of the essential oil and its components using DB. This method combines TLC separation with microbiological detection. It can be used for detection of antimicrobial activity of plant extracts (e.g., essential oils) after TLC separation. To the best of our knowledge, the present study is the first to investigate the biological activity of the above-mentioned essential oil against different *Staphylococcus* strains using TLC-bioautography.

Experimental

Chemicals

Thujone and 1,8-cineole (eucalyptol) were purchased from Sigma-Aldrich Ltd (Budapest, Hungary). TLC was performed on silica gel 60 F_{254} foil-backed TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase for TLC was prepared from analytical-grade solvents. These types of solvents obtained from VWR International Ltd (Debrecen, Hungary) were used in all experiments. Analytical-grade dye reagent MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was purchased from Sigma-Aldrich Ltd. Mueller-Hinton agar was obtained from Oxoid Ltd (London, UK) for the microbiological experiments.

Guest edited as a special report on "Thin-Layer Chromatography Hyphenated with Bioassays" by Irena Choma.
Corresponding author's e-mail: gyorgyi.horvath@aok.pte.hu
DOI: 10.5740/jaoacint.SGEHorvath

Gentamicin for injection (containing 80 mg/2 mL gentamicin; Sanofi-Aventis, Budapest, Hungary) and vancomycin (50 mg; Teva, Debrecen, Hungary) antibiotics were used as positive controls in the bioautographic method. In the case of vancomycin, 1 mg/mL stock solution was prepared using sterile distilled water.

Plant Material

The aerial parts of *A. adamsii* Besser were collected in Mongolia (near Ulan Bator) in July 2010. The plant was identified by a biologist, Dr. Tserennadmid Rentsenkhand (National University of Mongolia). The plant sample was air dried at room temperature (22°C) and pulverized just before distillation. A voucher specimen (*A. adamsii*) was prepared and deposited in the Herbarium of the Department of Pharmacognosy, University of Pécs, Hungary.

Essential Oil Isolation

The essential oil was isolated by steam distillation for 3 h using 25 g dried, powered plant material, according to the Hungarian Pharmacopoeia, 7th edition (17). Its oil content was measured directly by the volumetric method.

GC and GC/MS Measurements

A Fisons GC 8000 gas chromatograph (Carlo Erba, Milan, Italy) equipped with a flame ionization detector (FID) was used for the analysis of the essential oil components. The capillary column used was Rt-β-DEXm (Restek Corp., Bellefonte, PA), 30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness. Nitrogen was the carrier gas (6.86 mL/min flow rate); 0.2 mL 0.1% solution was injected (1 µL essential oil in 1 mL chloroform). A splitless injection was made. The temperatures of the injector and detector were 210 and 240°C, respectively. The column oven temperature was increased at a rate of 8°C/min from 60 to 230°C, with a final isothermal hold at 230°C for 5 min. Identification of peaks was made by retention time and standard addition; percentage evaluation was carried out by area normalization. All measurements were made in triplicate; RSD was below 4.5%.

GC/MS was performed with a coupled system comprising an Agilent (Santa Clara, CA) 6890N gas chromatograph, 5973N mass selective detector; Chrom Card Server version 1.2, and HP-5MS capillary column, 30 m long, 0.25 mm id., and 0.25 µm film thickness. Helium was the carrier gas (pressure, 0.20 MPa) at 1 mL/min flow rate; 1 µL (10 µL/mL essential oil in ethanol) was injected at 0.7 mg/mL velocity, splitless mode, with an Agilent 7683 autosampler. Injector temperature was 280°C, and the temperature of the transfer line 275°C. The oven temperature was held initially at 60°C for 3 min, increased at a rate of 8°C/min to 200°C, kept at 200°C for 2 min, and increased at a rate of 10°C/min to 250°C, with a final isothermal hold at 250°C for 15 min. MS conditions were: ionization energy, 70 eV; mass range, *m/z* 40–500; and 1 analysis/min. Peaks were identified based on the National Institute of Standards and Technology (Rockville, MD) spectral library and literature data (18).

TLC-DB

The process of TLC-DB can be divided into three parts: cultivation of test microorganisms for dipping; TLC of test materials (with or without separation); and postchromatographic microbial detection, i.e., DB.

(**a**) *Bacterial strains.*—*S. aureus* (ATCC 29213), *S. epidermidis* (1118), and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA 4262) were involved in the microbiological experiments. *S. epidermidis* and MRSA strains were isolated from blood cultures. All the examined test bacteria were maintained on Mueller-Hinton agar in the Institute of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs, Hungary

(**b**) *Cultivation of test bacteria for dipping.*—Bacteria used in this study were grown in 100 mL Mueller-Hinton nutrient broth (pH 7.3) at 37°C in a shaker incubator (Psycro Therm, New Brunswick Scientific Co., NJ) at a speed of 60 rpm for 24 h. The bacterial suspension was diluted with fresh nutrient broth to an OD_{600} of 0.4, which corresponds to approximately 4×10^7 CFU/mL.

(**c**) *TLC.*—Chromatography was performed on 5 × 10 and 10 × 10 cm aluminium foil backed silica gel 60 F_{254} plates. Before use, the plates were preconditioned by heating at 120°C for 2 h. First, the antibacterial activity of the essential oil and antibiotics was investigated without TLC separation. Then, the antibacterial effect of the essential oil components was studied after separation.

(*1*) *Preparing plates for TLC-DB without separation.*—Essential oil was dissolved in ethanol to give a 200 µL/mL solution, then 3–5 µL (equivalent to 0.6–1 µL undiluted oil) was applied to the 5 × 10 cm plates with Minicap capillary pipets (Hirschmann Laborgerate GmbH & Co. KG, Eberstadt, Germany). Antibiotic solutions (equivalent to 0.004 mg vancomycin and 0.16 mg gentamicin) were applied to the plates (4 µL each). The position of the standards and essential oil spots was 2 cm from the left side in one line, and between the spots there was a distance of 3–3 cm. TLC separation was not performed.

(*2*) *TLC separation preceding derivatization or DB.*—The antibacterial activity of the essential oil, as well as of its characteristic components (thujone and 1,8-cineole), were also investigated after TLC separation. Thujone and 1,8-cineole standards were dissolved in ethanol to give solutions of 10 µL/mL. Essential oil samples of 1, 3, and 5 µL and 2 µL aliquots of standard solutions were applied to the 10 × 10 cm plates, in duplicate, one plate for derivatization with vanillin–sulfuric acid reagent and the other for bioautography (Figures 1 and 2). The position of the starting line was 1.5 cm from the bottom and 1.5 cm from the left side. After sample application, the plates were developed with toluene–ethyl acetate (93 + 7, v/v; 19). Ascending development was used in a saturated twin trough chamber (CAMAG, Muttenz, Switzerland). All TLC separations were performed at room temperature (23°C). The separation distance was 8 cm, and development time approximately 20 min. After chromatographic separation, the adsorbent layers were dried at room temperature under air flow for 10 min to remove the mobile phase completely. Ethanolic vanillin–sulfuric acid reagent (19) was used to detect the separated compounds. The developed layers were dipped into this reagent and heated at 90°C for 3 min. Detection and identification of the separated compounds was performed on the basis of Rf values and colors of the standards. *Note*: The TLC plate for bioautography was prepared without the derivatization step.

(*3*) *Postchromatographic microbial detection–DB.*—The developed plates were dipped in approximately 80 mL bacterial suspension for 10 s, then dried under air flow for 2 min. The purity of the culture was checked by spreading out and cultivation

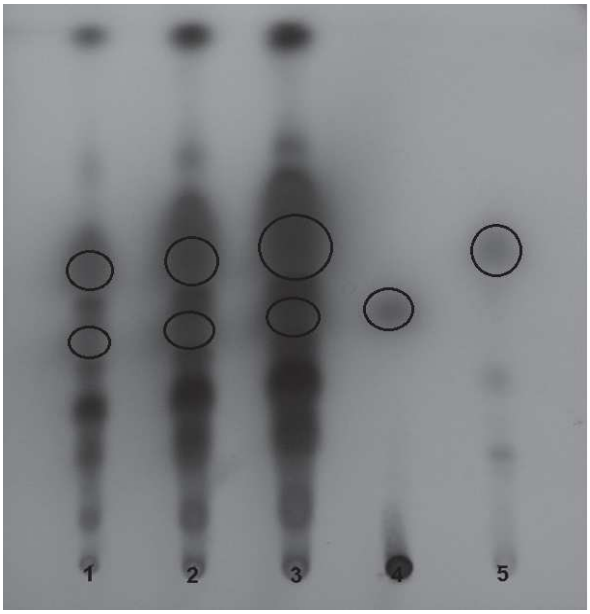


Figure 1. TLC separation of the essential oil of *A. adamsii* on silica gel 60 F_{254}. Solvent: toluene–ethyl acetate (93+7, v/v). Detection: alcoholic vanillin–sulfuric acid reagent. Sample application: lane 1: 1 µL oil, lane 2: 3 µL oil, lane 3: 5 µL oil, lane 4: 1,8-cineole standard (2 µL), and lane 5: thujone standard (2 µl). The black circles show the presence of 1,8-cineole and thujone in the oil sample.

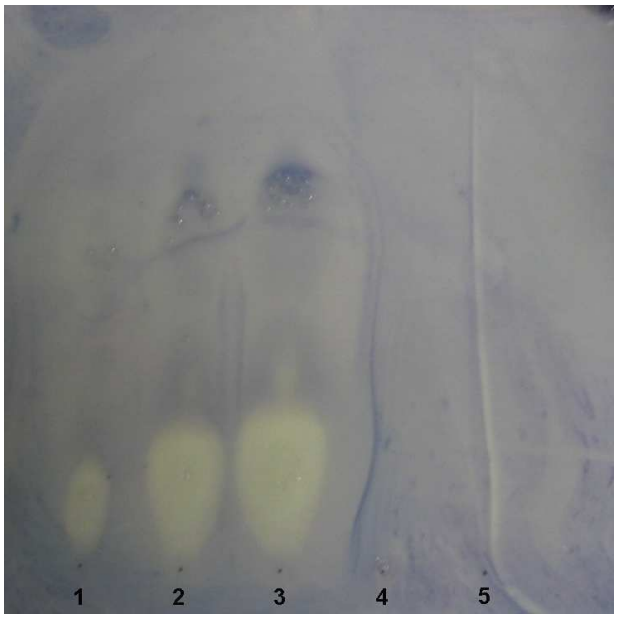


Figure 2. Detection of antibacterial activity of essential oil of *A. adamsii* by DB. Test bacterium: *S. epidermidis* (1118). Adsorbent: silica gel 60 F_{254}. Mobile phase: toluene–ethyl acetate (93 + 7, v/v). Sample application: lane 1: 3 µL oil, lane 2: 3 µL oil, lane 3: 5 µL oil, lane 4: 1,8-cineole standard (2 µL), and lane 5: thujone standard (2 µL).

on Mueller-Hinton agar plates. The TLC layers were incubated in a water vapor-saturated chamber (chamber dimension: 20 × 14.5 × 5 cm) at 37°C for 17 h, then dipped in an aqueous solution of MTT (50 mg/80 mL) for 10 s. Then, the plates were incubated at 37°C for 2 h, and photographed with a Canon PowerShot A95 camera. The inhibition zones of microbiologically active components were visualized by detecting dehydrogenase activity in living test bacteria with tetrazolium salt-based reagents (5, 6). On the TLC plate, metabolically active living bacteria converted MTT into blue formazan dye; therefore, the inhibition zones appeared as pale spots against a blue background. The diameters of the zones of inhibition were measured in mm. All bioautographic experiments were performed in triplicate.

Results and Discussion

Essential Oil Content and Composition

The essential oil yield was 0.56 mL/100 g of dried plant material. The color of the oil obtained by steam distillation was pale yellow. Using GC and GC/MS analysis, the presence of thujones in the oil was confirmed; α-thujone was the main component (64.4%), while the amount of β-thujone was much lower (7.1%.). The presence of 1.8-cineole (15.2%) was also confirmed by GC/MS. Other components were *p*-cymene (1.5%), terpinen-4-ol (1.5%), linalool (0.4%), and spatulenol (1.8%). The occurrence of these components in the oil could also be confirmed by GC/MS (Table 1). In the future, we plan to examine the composition of this oil by an SPME (solid phase microextraction) technique, which is frequently used in the analysis of essential oil composition.

TLC

In the essential oil, thujone could be identified as a single compound at R_f 0.56 compared to the thujone standard (Figure 1). α- and β-Thujone could not be separated by TLC with the mobile phase toluene–ethyl acetate (93+7, v/v) due to their similar R_f values. The spot of 1,8-cineole was identified at approximately R_f 0.45 compared to the 1,8-cineole standard. The small differences between the R_f values can be seen on the TLC layer because of the increasing concentration of the oil. According to ref. 19, the terpene zones can be found in the 0.15–0.45 R_f range in the essential oil of *Artemisia* species. The terpinen-4-ol component was identified at R_f 0.37, according to ref. 19. Linalool (R_f 0.33) was also determined based on this reference. The presence of these components in the oil was confirmed by GC and GC/MS.

TLC-DB

The antibacterial activity of the essential oil and its separated compounds was estimated by DB. Initially, TLC separation of the essential oil was not performed so that the effect of control antibiotics could be compared with the oil. The antibacterial activity was expressed as the diameter (mm) of inhibition zones (Table 2). All bacterial strains used in this study were sensitive to one of the antibiotics (gentamicin or vancomycin) and the oil of *A. adamsii*. *S. epidermidis* was the most sensitive strain. Compared to antibiotics, a higher concentration of the oil must be applied to achieve the effectiveness of the antibiotics used in this study (Figure 3). After TLC separation, the antibacterial effect of the essential oil components could be detected. In every case, the terpene components showed antibacterial activity in the 0.15–0.37 R_f range, and the inhibition zones appeared as pale white spots around the separated constituents. In this case, *S. epidermidis* was

Table 1. Composition of *A. adamsii* essential oil[a]

Compounds	Retention time, min		Composition, %	
	FID	MS	FID	MS
p-Cymene	7.68	8.08	1.5	1.0
1,8-Cineole	7.95	8.31	15.2	15.9
Linalool	9.84	7.84	0.4	0.9
α-Thujone	10.38	10.66	64.4	77.6
β-Thujone	10.66	11.02	7.1	6.5
Terpinen-4-ol	11.69	13.14	1.5	1.3
Spatulenol	18.01	24.95	1.8	1.5

[a] All measurements were made in triplicate; RSD values were below 4.5%.

Table 2. Antibacterial activity (expressed as the diameter in mm of inhibition zones) of the essential oil of *A. adamsii* and antibiotic standards detected by DB[a]

Bacterial strains	Essential oil		Gentamicin	Vancomycin
	3 µL	5 µL	4 µL	4 µL
S. aureus ATCC 29213	4	5	7	—
Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA 4262)	4.5	5.5	—	7
S. epidermidis (1118)	5	6	9	—

[a] The values are averages of three parallel measurements. 3–5 µL oil (equivalent to 0.558–0.903 mg undiluted oil) and 4 µL antibiotics (equivalent to 0.004 mg vancomycin and 0.16 mg gentamicin) were applied to TLC plates.

also the most sensitive bacterium (Figure 2). According to ref. 19 and our GC results, we supposed that terpinen-4-ol and linalool were the bioactive compounds in the oil of *A. adamsii*. Thujone as the main component of the oil had no apparent antibacterial activity at the concentration at which it was present in the oil. The standards of thujone and 1,8-cineole did not show activity in the bioautographic system, as well.

The antibacterial activity of different *Artemisia* essential oils belonging to thujone chemotype has already been published (20, 21). In these experiments the agar diffusion method was used. According to results presented in the references, the essential oil samples showed antimicrobial activity. It should be noted that the conventional microbiological assays used for determination of antibacterial effect of essential oils do not provide information about the activity of the individual components, including the synergistic effect. Our results confirmed that the antibacterial activity of the essential oil obtained from *A. adamsii* is not proportional to the concentrations of α-, β-thujone, and 1,8-cineole; therefore, from a microbiological aspect, these components do not determine the medicinal value of this oil.

This study showed that DB is an appropriate method for detection of plant products (e.g., essential oils) with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. Interest in the idea of using volatile oils against pathogenic microbes keeps growing because, in contrast to antibiotics, resistance rarely develops due to the large number of their components. Bioautography facilitates the investigation of microbiologically active hydrophobic plant extracts containing a large number of compounds.

In our experiments, the oil of this plant showed antibacterial

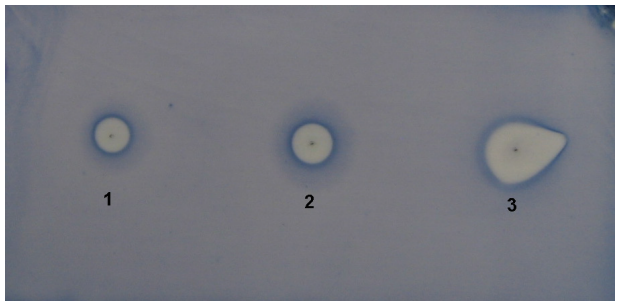


Figure 3. Detection of antibacterial activity of essential oil of *A. adamsii* by DB. Test bacterium: MRSA 4262. Adsorbent: silica gel 60 F_{254}. Sample application: lane 1: 3 µL oil (equivalent to 0.558 mg undiluted oil), lane 2: 5 µL oil (equivalent to 0.903 mg undiluted oil), lane 3: and 4 µL vancomycin solution (equivalent to 0.004 mg antibiotic)

activity in the bioautographic system; however, its medical application for internal use is not recommended because of the thujone content. The essential oil of *A. adamsii* might be useful as a disinfectant in controlling hospital infections caused by antibiotic-resistant bacteria, e.g., MRSA. Bouaziz et al. published the disinfectant properties of thujone-type essential oil obtained from *Salvia officinalis* (22). Vaporization of 0.25 mL/m^3 of *S. officinalis* oil reduced the total microbial count after residence times of 1, 6, and 24 h in a selected testing room.

In our further studies, we will investigate the composition of *A. adamsii* oil by an SPME technique and determine the mode of action of the oil and its individual components using different microbiological and chromatographic methods. Undoubtedly, TLC-bioautography allows a rapid identification of the active compound or compounds in a complex mixture.

Acknowledgments

We thank Tserennadmid Rentsenkhand (National University of Mongolia, School of Biology) for supplying and identifying the plant material, Erika Kocsis for technical support in the microbiological experiments, and Andrea Böszörményi, Éva Lemberkovics, and Szabolcs Szarka for the GC analyses. This work was financially supported by the OTKA PD 104660 grant.

References

(1) Goodall, R.R., & Levi, A.A. (1946) *Nature* **158**, 675–676. http://dx.doi.org/10.1038/158675a0
(2) Fischer, R., & Lautner, H. (1961) *Arch. Pharm.* **294**, 1–7. http://dx.doi.org/10.1002/ardp.19612940102
(3) Betina, V. (1973) *J. Chromatogr.* **78**, 41–51. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)99035-1
(4) Rios, J.L., Recio, M.C., & Villar, A. (1988) *J. Ethnopharmacol.* **23**, 127–149. http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3
(5) Botz, L., Nagy, S., & Kocsis, B. (2001) in *Planar Chromatography*, Sz. Nyiredy (Ed), Springer, Budapest, Hungary, pp. 489–516
(6) Choma, I., & Grzelak, E.M. (2011) *J. Chromatogr. A* **1218**, 2684–2691. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069
(7) Grzelak, E.M., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I.M. (2011) *J. AOAC Int.* **94**, 1567–1572. http://dx.doi.org/10.5740/jaoac.10-385
(8) Móricz, M.Á., Horváth, Gy., Molnár, P., Kocsis, B., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., & Ott, G.P. (2010) *J.*

Planar Chromatogr. –Mod.TLC **23**, 406–410. http://dx.doi.org/10.1556/JPC.23.2010.6.4

(9) Horváth, Gy., Szabó, L.GY., Lemberkovics, É., Botz, L., & Kocsis, B. (2004) *J. Planar Chromatogr. –Mod.TLC* **17**, 300–304. http://dx.doi.org/10.1556/JPC.17.2004.4.11

(10) Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N.A., & Piozzi, F. (2009) *J. Ethnopharmacol.* **126**, 265–272. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.034

(11) Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., & Delarmelina, C. (2005) *J. Ethnopharmacol.* **97**, 305–311. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016

(12) Bag, A., Bhattacharyya, S.K., Pal, N.K., & Chattopadhyay, R.R. (2012) *Microbiol. Res.* **167**, 352–357. http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.005

(13) Hood, J.R., Wilkinson, J.M., & Cavanagh, H.M.A (2003) *J. Essent. Oil Res.* **15**, 428–433. http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2003.9698631

(14) Yu, H., & Zhong, S. (2002) in *Medicinal and Aromatic Plants*, Vol. 18 (Artemisia), C.W. Wright (Ed.), Taylor and Francis, London, UK, pp. 149–158

(15) Bohlmann, F., Hartono, L., Jakupovic, J., & Huneck, S. (1985) *Phytochemistry* **24**, 1003–1007. http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83171-4

(16) Shatar, S. (1986) *Pharmazie* **41**, 819–820

(17) *Hungarian Pharmacopoeia,* 7th Ed. (1986) *Vol. 1*, *Medicina Könyvkiadó*, Budapest, Hungary, p. 396

(18) Adams, R.P. (2001) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry*, 4th Ed., Allured Publishing, Carol Stream, IL, pp 81, 84, 106, 110, 138, 320

(19) Wagner, H., & Bladt, S. (2001) *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd Ed., Springer, Berlin, Germany, pp 90–91

(20) Mighri, H., Hajlaoui, H., Akrout, A., Najjaa, H., & Neffati, M. (2010) *C. R. Chimie* **13**, 380–386. http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2009.09.008

(21) Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S., & Kolodziejczyk, P.P. (2008) *Phytochemistry* **69**, 1732–1738. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014

(22) Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., & Dhouib, A. (2009) *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2755–2760. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.08.005

NPC Natural Product Communications

2016
Vol. 11
No. 11
1709 - 1712

Essential Oils and Their Vapors as Potential Antibacterial Agents against Respiratory Tract Pathogens

Kamilla Ács[a], Tímea Bencsik[a], Andrea Böszörményi[b], Béla Kocsis[c] and Györgyi Horváth[a*]

[a]*Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Pécs, Hungary*
[b]*Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University, Budapest, Hungary*
[c]*Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary*

gyorgyi.horvath@aok.pte.hu

Received: January 28th, 2016; Accepted: June 7th, 2016

Dedicated to Prof. Dr. Wilhelm Fleischhacker on account of his 85th Birthday.

Increasing appearance of antibiotic-resistant pathogens, which could be one of the major causes of respiratory tract infections, has again drawn attention to natural substances and alternative treatments. Therefore, the aim of the present study was the antibacterial evaluation of cinnamon bark, clove, thyme, citronella, peppermint, Scots pine, and eucalyptus essential oils (EOs) against respiratory tract pathogens such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa* with *in vitro* vapor phase (VP) and tube dilution (TD) techniques. The chemical and percentage compositions of the EOs were determined by GC-FID and GC-MS analysis. Among the EOs, cinnamon bark was the most effective against all the investigated pathogens (MIC: 31.25-125 µL/L) in the VP assay, but clove oil presented the best inhibition against MRSA in liquid medium (MIC: 0.1 mg/mL). Thyme oil also showed antibacterial activity against MRSA and the antibiotic-sensitive strain of *P. aeruginosa* in both methods. In higher concentration, we found that peppermint oil was effective only in vapor form; contrarily, eucalyptus oil was more efficient in liquid medium. Surprisingly, Scots pine did not show any activity in our test systems. These results suggest that EOs could be promising solutions for the problem of antibiotic resistance due to their multiple composition and complex mode of action. However, more *in vivo* studies are necessary to calculate the effective dose of EOs in patients and determine their possible side effects and toxicity.

Keywords: Essential oil, Antibacterial, Antibiotic resistance, Vapor phase, Tube dilution, Respiratory tract.

According to the World Health Organization (WHO), lower respiratory tract infections (RTIs) were responsible for 5 and 6% of deaths among men and women, respectively, in 2012 [1-2].

Among antibiotic-resistant bacteria causing severe respiratory infections, this study focuses only on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa*. MRSA is a Gram-positive healthcare-associated pathogen causing tonsillitis and pneumonia, mainly in immunodeficient patients [3]. MRSA shows resistance to all β-lactam antibiotics, except the fifth generation cephalosporin, ceftobiprole, due to its mutant penicillin-binding protein (PBP2A) encoded by the *mecA* gene [4]. Furthermore, the increased application of vancomycin has led to the appearance of vancomycin-resistant strains [5]. The Gram-negative *P. aeruginosa* is one of the major causes of hospital-acquired pneumonia. Unfortunately, the fast expanding multifactorial resistance of this pathogen to antipseudomonal drugs highly influences the success of the therapy [6].

The antimicrobial potential of essential oils (EOs) has already been studied by several *in vitro* techniques, but these methods usually investigate the antimicrobial activity of the EOs only in liquid media instead of vapor phase (VP) [7]. The main disadvantage of these assays includes the application of emulsifiers, and different parameters [8]. Some EOs have traditionally been used for the treatment of common cold, cough or airway inflammation [9]. In the case of RTIs, the vapor of EOs can simply pass into the airway and comes into direct contact with the infected surface [1]. Therefore, it would be more reasonable to investigate the antimicrobial effect of EOs in the vapor phase.

Several studies have demonstrated the better antimicrobial effect of EOs in vapor form than in liquid phase against several respiratory tract microorganisms [10a-c].
Scientists suggest that the complex composition of EOs may be responsible for the fact that bacteria hardly develop resistance against them [8]. For the *in vitro* assessment of antimicrobial efficacy of EO vapors, three screening methods are most frequently used nowadays. Two of them are cost-effective modified disc diffusion methods in which a more uniform VP develops [11a-b, 12]. In the third method, the Petri dishes are placed into a large closed chamber where the EO and the pathogens are positioned separately [10a]. Unfortunately, there is no standardized *in vitro* VP method nowadays, and the comparison of the results of different studies is very difficult or even impossible.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the antibacterial effect of EOs of cinnamon bark, clove, eucalyptus, Scots pine, peppermint, citronella, and thyme with *in vitro* tube dilution (TD) and VP techniques against pathogens responsible for nosocomial RTIs.

Chemical analyses of EOs were performed by GC-FID and GC-MS techniques. Identified compounds and percentage evaluation of the oils are shown in Table 1. In all samples, the amount of the detected components was above 96%. In accordance with the literature, the main components of cinnamon bark oil, citronella, and clove were *trans*-cinnamaldehyde (74.0%), citronellal (36.2%), and eugenol (88.6%), respectively. Eucalyptus oil contained 1,8-cineole (84.8%). In the EOs of peppermint, Scots pine, and thyme, menthol (50.4%), α-pinene (39.4%), and thymol (46.3%) were presented, respectively. Besides the major constituents of the EOs, previously reported antibacterial agents such as *p*-cymene, limonene, carvacrol,

Table 1: Percentage composition of EOs used in the study by GC-MS and GC-FID.

Compound	Retention time (min)		Percentage of compounds (%)						
	MS	FID	1	2	3	4	5	6	7
α-Pinene	5.9	5.7	0.5	-	-	1.1	1.1	39.4	0.9
Camphene	6.3	6.2	-	-	-	-	-	0.8	0.9
Fenchene	6.4	6.6	-	-	-	-	-	1.1	-
β-Pinene	6.9	6.7	-	-	-	0.5	0.6	11.0	1.4
δ-3-Carene	7.6	7.0	-	-	-	-	-	7.0	-
α-Terpinene	7.7	7.2	-	-	-	-	-	-	2.2
Limonene	7.9	7.4	1.4	3.5	-	6.4	1.4	14.3	-
p-Cymene	7.8	7.6	1.2	-	-	6.9	0.2	-	22.1
1,8-Cineole	8.0	7.9	2.1	-	-	84.8	5.5	-	9.8
γ-Terpinene	8.6	8.5	-	-	-	-	-	-	0.3
Linalool	10.1	10.1	3.8	-	-	-	-	-	5.1
Neral	10.3	10.2	-	1.0	-	-	-	-	-
Citronellal	10.4	11.0	-	36.2	-	-	-	-	-
Isopulegon	10.5	11.1	-	-	-	-	1.0	-	-
Geranial	10.7	11.2	-	2.2	-	-	-	-	-
Menthone	10.6	11.2	-	-	-	-	19.8	-	-
Isomenthon	10.8	11.5	-	-	-	-	7.0	-	-
Isomenthol	10.9	11.6	-	-	-	-	4.3	-	-
Terpinen-4-ol	11.5	11.7	-	-	-	-	-	-	0.6
Menthol	11.1	11.9	-	-	-	-	50.4	-	-
α-Terpineol	11.4	12.3	1.5	-	-	-	-	8.8	-
Borneol	11.0	12.4	-	-	-	-	-	-	1.0
Citronellol	11.9	12.9	-	13.6	-	-	-	-	-
Menthyl acetate	13.1	13.0	-	-	-	-	5.5	-	-
Bornyl acetate	13.0	13.0	-	-	-	-	-	3.4	-
Geraniol	12.4	13.4	-	25.3	-	-	-	-	-
Anethol	13.1	13.5	2.3	-	-	-	-	-	-
Piperitone	12.6	13.8	-	-	-	-	0.8	-	-
Menthofurane	16.7	13.9	-	-	-	-	0.2	-	-
Citronellyl acetate	14.1	14.1	-	2.3	-	-	-	-	-
Geranyl acetate	14.5	14.2	-	2.6	-	-	-	-	-
Longiferene	15.3	14.4	-	-	-	-	-	0.5	-
β-Elemene	14.9	14.7	-	2.9	-	-	-	-	-
β-Caryophyllene	15.4	14.8	1.7	-	8.6	-	0.4	8.4	2.5
Trans-Cinnamaldehyde	12.9	14.9	74.0	-	-	-	-	-	-
α-Humulene	16.0	15.4	-	-	2.2	-	-	0.8	-
Thymol	13.2	15.6	-	-	-	-	-	-	46.3
Eugenol	14.3	15.8	2.7	-	88.6	-	-	-	-
β-Cubebene	16.4	15.8	-	0.9	-	-	-	-	-
Carvacrol	13.3	15.9	-	-	-	-	-	-	3.2
β-Cadinene	17.0	16.0	-	1.0	-	-	-	-	-
Elemol	17.4	16.4	-	2.4	-	-	-	-	-
Cinnamyl acetate	15.8	16.9	5.3	-	-	-	-	-	-
Eudesmol	19.1	18.3	-	2.3	-	-	-	-	-
Caryophyllene oxide	18.0	18.8	-	-	0.5	-	0.1	0.7	-
Total (%):			**96.5**	**96.2**	**99.9**	**99.7**	**98.3**	**96.2**	**96, 3**

Table shows the average content of volatile compounds from 3 parallel measurements. The standard deviations (SD) were below 4.5%. 1. cinnamon bark, 2. citronella, 3. clove, 4. eucalyptus, 5. peppermint, 6. Scots pine, 7. thyme

β-caryophyllene, α-terpineol, and geraniol were also detected, but in lower concentrations [8,9].

In the microbiological tests, we examined MRSA and two strains of *P. aeruginosa* as potential respiratory tract pathogens. The antimicrobial susceptibility of these bacteria was preliminary confirmed by the disc diffusion method (data not shown). One of the *P. aeruginosa* strains (later referred to as resistant strain) was resistant to imipenem and ciprofloxacin, but was sensitive to gentamicin and polymyxin B; the other one (later referred to as sensitive strain) was sensitive to all tested antibiotics. Gentamicin and vancomycin were effective against MRSA.

With the TD method, we were able to observe the direct inhibitory effect of the EOs in liquid medium, while application of the VP method allowed us to detect the antimicrobial potency of volatile components exclusively. The antibacterial effects of EOs are summarized in Tables 2 and 3. In the TD method, the EOs of cinnamon bark, thyme, clove, citronella, and eucalyptus presented activity against MRSA, with minimum inhibitory concentration (MIC) values in the range of 0.1-5.6 mg/mL (Table 2.). Among them, clove oil was the most active; thyme and cinnamon bark oils showed similar activity. Unfortunately, peppermint and Scots pine oils had only bacteriostatic effects, i.e., at the highest concentration

Table 2: Antibacterial activity of EOs of cinnamon bark, thyme, clove, peppermint, citronella, eucalyptus, Scots pine, and thyme by tube dilution method.

EO Sample	MRSA		*P. aeruginosa* [a]		*P. aeruginosa* [b]	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Cinnamon	0.4	0.8	0.4	0.8	0.4	0.8
Thyme	0.4	0.7	>45.3	>45.3	1.4	2.8
Clove	0.1	0.2	>51.9	>51.9	1.6	3.3
Peppermint	>44.5	>44.5	>44.5	>44.5	>44.5	>44.5
Citronella	1.4	2.8	>43.9	>43.9	>43.9	>43.9
Eucalyptus	5.6	11.3	>45.1	>45.1	2.8	5.6
Scots pine	>43.4	>43.4	>43.4	>43.4	>43.4	>43.4

a: resistant strain, b: sensitive strain, MIC: minimum inhibitory concentration (in mg/mL), MBC: minimum bactericidal concentration (in mg/mL).

Table 3: Antibacterial activity of EOs of cinnamon, thyme, clove, peppermint, citronella, eucalyptus, Scots pine, and thyme by vapor phase technique.

EO Sample	MIC (µL/L)		
	MRSA	*P. aeruginosa* [a]	*P. aeruginosa* [b]
Cinnamon	31.25	125	31.25
Thyme	125	>1000	31.25
Clove	225	>1500	>1500
Peppermint	375	>1500	>1500
Citronella	375	>1500	>1500
Eucalyptus	>1500	>1500	>1500
Scots pine	>1500	>1500	>1500

a: resistant strain, b: sensitive strain. MIC: minimum inhibitory concentration [amount of EO in µL referred to airspace volume (L)].

Table 4: Antibacterial activity of gentamicin, vancomycin, and polymyxin B by tube dilution method.

Antibiotic	MRSA		*P. aeruginosa* [a]		*P. aeruginosa* [b]	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gentamicin	12.5	25.0	>100*	>100*	6.3	12.5
Vancomycin	>100*	>100*	-	-	-	-
Polymyxin B	-	-	1.6	3.1	-	-

a: resistant strain, b: sensitive strain, * the strain was not sensitive enough to the used standard concentrations of the antibiotic. MIC: minimum inhibitory concentration (in µg/mL), MBC: minimum bactericidal concentration (in µg/mL)

of the EOs used in our study, we could not observe total inhibition of the visible growth of any test bacteria. Against the sensitive strain of *P. aeruginosa*, the same EOs showed visible inhibition, except for citronella that showed moderate activity, similar to those of Scots pine and peppermint oils. Only cinnamon bark oil inhibited the growth of the resistant *P. aeruginosa* (MIC: 0.4 mg/mL). In comparison, the most active oils produced higher MIC values than the reference antibiotics (Tables 2 and 4). Polysorbate 80, used as the emulsifier control, did not show any activity against any of the tested bacteria.

The MIC values obtained from the VP technique were determined considering the amount of EOs (µL) and referring to the free airspace (L) in the Petri dish (Table 3). Similarly to the TD method, the EO vapor of cinnamon bark, clove, thyme, and citronella effectively inhibited the growth of MRSA; the MIC values were in the range of 31.25-375 µL/L. Cinnamon bark oil produced the lowest MIC value (31.25 µL/L) against this pathogen. In the case of the sensitive strain of *P. aeruginosa*, the EOs of thyme and cinnamon bark were equally active (MIC: 31.25 µL/L). The total inhibition of the growth of the resistant *P. aeruginosa* required a higher dose of cinnamon bark oil (MIC: 125 µL/L). In higher concentration, peppermint oil showed activity against MRSA (MIC: 375 µL/L), in contrast with the result of the TD, where no antibacterial effect was detected. Eucalyptus oil did not present inhibition against any test bacteria even in a 1500 µL/L concentration, which also differs from the results of the TD method. These findings suggest that clove and eucalyptus oils could be more potent antibacterial agents in liquid form; however, cinnamon bark and peppermint oils should be used via inhalation for medical treatment. In addition, the blank filter papers and the solvent of EOs did not influence the bacterial growth. Contrary to our findings, several studies have not detected any activity of thyme and cinnamon bark oils in VP against the sensitive strain of *P.*

aeruginosa. However, Scots pine and clove oils were found similarly inactive, which corresponds with our observations [11a, 13a-c]. Contrary to our results, Tyagi and Malik detected moderate activity of the vapor of eucalyptus oil in the VP assay against *P. aeruginosa* [14].

In our study, we successfully optimized an *in vitro* system where the antibacterial activity of EO vapors could be evaluated directly. We conclude that the EOs of cinnamon bark, clove, citronella, peppermint and thyme have significant antibacterial effect in vapor form against at least one respiratory tract pathogen involved in this study. The vapor of cinnamon bark EO showed the strongest inhibition of MRSA and the resistant strain of *P. aeruginosa*. We assume that the antibacterial activity of EOs is related to their main component, but further experiments are needed to confirm this hypothesis. Although, the exact mode of action of EOs and their components is not clearly understood as yet, it was previously reported that cinnamaldehyde could disrupt the structure of bacterial cells and alter the energy metabolism [8]. Therefore, we suggest that the above mentioned oils, especially via inhalation, may support the antimicrobial therapy in the case of RTIs. Moreover, EOs usually have additional effects, e.g. antifungal, antiviral, anti-inflammatory, and immune modulator properties which make them more valuable agents either alone or in combination with other substances [9]. Unfortunately, Scots pine and eucalyptus oils did not show significant activity in our VP system. In TD, we found that cinnamon, thyme and citronella EOs were active against MRSA, which correlates with our results obtained with the VP method. Clove and eucalyptus oils showed better inhibition in liquid medium than in VP, whereas peppermint oil was more effective in vapor form. Pereira *et al*. also highlighted the therapeutic potency of eucalyptus oil in liquid medium against several clinical isolates of *P. aeruginosa* [15]. In comparison with our results, Tyagi and Malik also reported antibacterial potential of eucalyptus oil against *P. aeruginosa* measured by TD assay; however, the determined MIC values and the applied EO concentrations were much higher than ours [14]. Contrary to our results, they reported that peppermint was an active substance against this pathogen in both vapor and liquid form [16]. On the whole, we observed that the Gram-negative strains were less sensitive to the EOs than the Gram-positive MRSA in both *in vitro* methods, which correlates well with a previously published result [10c].

Considering our VP results, we also suggest that cinnamon, clove, thyme, citronella, and peppermint oils could be effective air disinfectants, especially in healthcare environments such as nursing homes, ambulances, and surgeries. We also suppose that the constant evaporation of EOs is necessary to achieve their antimicrobial activity in airspace. Therefore, development of state-of-the-art devices is also desirable. Finally, *in vivo* and clinical studies are also required to calculate the effective doses of EOs and to determine the possibility of EOs' side effects and toxicity.

Experimental

Essential oil samples: The EOs of cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.), clove {*Syzygium aromaticum* (L.) Merill & Perry}, thyme (*Thymus vulgaris* L.), eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.), Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), peppermint (*Mentha* x *piperita* L.), and citronella {*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle} were obtained from Aromax Ltd. (Budapest, Hungary).

Gas chromatographic analysis: The chemical composition of the EOs was determined by gas chromatography (GC) coupled with a mass selective detector (MSD). A flame ionization detector (FID) was also used to evaluate the percentage composition of the EOs.

GC-MS conditions: The analyses were carried out with an Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) system equipped with an Agilent SLB-5MS capillary column (30 m × 250 µm × 0.25 µm). The GC oven temperature was programmed to increase from 60ºC (3 min isothermal) to 250ºC at 8ºC/min (1 min isothermal). High purity helium as a carrier gas was used at 1.0 mL/min (37 cm/s) in constant flow mode. The injector temperature was 250°C and the split ratio was 1:50. The MSD was equipped with a quadrupole mass analyzer and operated in electron ionization mode at 70 eV in full scan mode (41–500 amu at 3.2 scan/s). The data were evaluated using MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent). The identification of the compounds was carried out by comparing retention times and recorded spectra with the data of authentic standards, and the NIST 2.0 library was also used.

GC-FID conditions: The analyses were made using a Fisons GC 8000 gas chromatograph (Carlo Erba, Italy), equipped with a FID. An Rt-β-DEXm (Restek) capillary column, 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, was used. The carrier gas was nitrogen at 6.8 mL/min flow rate. A 0.2 mL volume of a 0.1% solution of the oil was injected (1 mL EO in 1 mL chloroform). Splitless injection was carried out. The temperatures of the injector and detector were 210°C and 240°C, respectively. The oven temperature was increased at a rate of 8°C/min from 60°C to 230°C, with a final isotherm at 230°C for 5 min. Identification of peaks was made by retention data compared with data obtained by GC-MS and data of standards (Fluka Analytical and Sigma-Aldrich); percentage evaluation was carried out by area normalization. Three parallel measurements were made; RSD percentages were below 4.5%.

Chemicals and antimicrobial assays: The TD method was used for the detection of antibacterial activity of EOs in liquid medium. The effect of EOs was also compared with the activity of standard antibiotics: gentamicin (Sanofi-Aventis, Budapest, Hungary), vancomycin (TEVA, Debrecen, Hungary), and polymyxin B (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Hungary). The VP technique was also carried out to determine the antibacterial effect of EO vapors. The absolute ethanol was obtained from Molar Chemicals Ltd. (Halásztelek, Hungary). The emulsifier (Polysorbate 80) was purchased from Reanal Ltd. (Budapest, Hungary). Mueller-Hinton agar was purchased from Oxoid Ltd. (London, UK).

Bacterial strains: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, 4262) and the antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (34205) were isolated from blood cultures and were maintained at the Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs (Pécs, Hungary). A standard, antibiotic-sensitive strain of *P. aeruginosa* (ATCC 27853) was obtained from the American Type Culture Collection, Wesel, Germany/USA. All test microorganisms were maintained on Mueller-Hinton agar at 37°C. Antibiotic susceptibility of bacteria was tested by the disc diffusion method according to the guidelines of the Manual of Clinical Microbiology [17].

Tube dilution test: The experiments were carried out according to the Manual of Clinical Microbiology, with some modifications [17]. Due to the hydrophobic character of EOs, emulsions were made for the proper determination of antibacterial activity. In the case of EOs, a serial twofold dilution was prepared from 5.00 to 0.01%. The control tube of the bacterial growth contained neither EO nor detergent. Nutrient broth containing 0.2% of Polysorbate 80 was also used separately as a detergent/emulsifier control. For the dilution series of antibiotics, the emulsifier was not used. Ten µL of an overnight bacterial culture (~ 4×10^7 cells/mL) was added to each tube and incubated at 37°C for 24 h. Then, the tubes were

plated out on Mueller-Hinton agar and incubated again for 48 h. The number of bacterial colonies was compared with the controls and then the values of the minimum bactericidal concentrations (MBC) and minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined. The MBC is the lowest concentration of an antibacterial agent able to inhibit completely the growth of colonies. The MIC value is the concentration that could reduce the visible growth of bacteria in comparison with the controls. All tests were carried out in triplicate.

Vapor phase test: The *in vitro* VP tests were based on a previously published study by Kloucek *et al.*, with some changes [11b]. The test system was developed in a 4-section Petri dish (PD, diameter 90 mm, VWR, Debrecen, Hungary) containing 5 mL Mueller-Hinton broth in each section. Contrary to the above mentioned authors, we did not pour any agar into the upper lid of the PD, because it would result in the attachment of the filter paper disc to the agar surface thereby reducing the spread of volatile components into the airspace. All bacteria were grown in Mueller-Hinton broth at 37°C for 24 h before the assay and then inocula were made by dilution in sterile 0.9% saline to 10^5 CFU/mL. Then, 3 sections of the PD were inoculated with 20 µL of the bacterial suspensions. Different strains were spread into each section. The fourth uninoculated compartment was the contamination control. Each EO sample was diluted in absolute ethanol and distributed on the surface of a sterile filter paper (thickness 0.18 mm, Albet-Hahnemühle, Germany) disc 84 mm in diameter. After evaporation of the solvent, the disc was placed on the wall separating the compartments of the PD. Therefore, there was approximately 2 mm distance between the disc and the inoculated agar surface. Finally, PDs were hermetically closed with parafilm adhesive tape (Sigma Aldrich Ltd., Budapest, Hungary) to avoid evaporation of the EO out of the PD and they were incubated at 37°C for 48 h. After incubation, filter papers were removed and MIC values were determined. The MIC is the lowest concentration of an EO (expressed as µL of EO/free atmosphere above the growing microorganism) which can absolutely inhibit the visible growth of the bacteria. Filter paper discs containing ethanol or nothing were used as controls. All tests were carried out in triplicate.

Acknowledgments - We would like to thank especially Mrs Erika Kocsis for the microbiological assistance. This work was financially supported by NKFI 104660 grant (previously Hungarian Scientific Research Fund, OTKA PD 104660).

References

[1] Horváth Gy, Ács K. (**2015**) Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, ***30***, 331–341.

[2] World Health Organization: Ten leading causes of death. http://apps.who.int/gho/data/view.wrapper.MGHEMORTCAUSE10-2012?lang=en [accessed 15 January 2016]

[3] Que YA, Moreillon P. (**2015**) *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome). In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases*. Vol. ***2***, 8th edition. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. (Eds), Elsevier Saunders, USA, 2237-2271.

[4] Chambers HF, Sachdeva M. (**1990**) Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases*, ***161***, 1170–1176.

[5] Hiramatsu K. (**2001**) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infectious Diseases*, ***1***, 147–155.

[6] Riou M, Carbonnelle S, Avrain L, Mesaros N, Pirnay JP, Bilocq F, De Vos D, Simon A, Piérard D, Jacobs F, Dediste A, Tulkens PM, Van Bambeke F, Glupczynski Y. (**2010**) *In vivo* development of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the lower respiratory tract of intensive care unit patients with nosocomial pneumonia and receiving antipseudomonal therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, ***36***, 513–522.

[7] Pauli A, Schilcher H. (**2010**) *In vitro* antimicrobial activities of essential oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. In *Handbook of Essential Oils. Science, Technology, and Application*. Baser KHC, Buchbauer G. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 353-547.

[8] Kon KV, Rai MK. (**2012**) Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, ***10***, 775–790.

[9] Ali Al Yousef S. (**2014**) Essential oils: their antimicrobial activity and potential application against pathogens by gaseous contact - a review. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, ***6***, 37-54.

[10] (a) Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. (**2001**) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, ***47***, 565–573; (b) Mondello F, Girolamo A, Scaturro M, Ricci ML. (**2009**) Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapor controlled conditions. *Journal of Microbiological Methods*, ***77***, 243–248; (c) Doran AL, Morden WE, Dunn K, Edwards-Jones V. (**2009**) Vapor-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. *Letters in Applied Microbiology*, ***48***, 387–392.

[11] (a) López P, Sánchez C, Batlle R, Nerín C. (2005) Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 6939–6946;

[12] Laird K, Phillips C. (**2011**) Vapor phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology*, ***54***, 169–174.

[13] (a) Ghabraie M, Vu KD, Tata L, Salmieri S, Lacroix M. (**2016**) Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Science and Technology*, ***66***, 332-339; (b) Kloucek P, Smid J, Frankova A, Kokoska L, Valterova I, Pavela R. (**2012**) Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*, ***47***, 161–165; (c) Goñi P, López P, Sánchez C, Gómez-Lus R, Becerril R, Nerín C. (**2009**) Antimicrobial activity in the vapor phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, ***116***, 982–989.

[14] Tyagi AK, Malik A. (**2011**) Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapor phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, ***126***, 228–235.

[15] Pereira V, Dias C, Vasconcelos MC, Rosa E, Saavedra MJ. (**2014**) Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*, ***52***, 1-7.

[16] Tyagi AK, Malik A. (**2011**) Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapor phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, ***22***, 1707-1714.

[17] Patel JB, Tenover FC, Turnidge JD, Jorgensen JH. (**2011**) Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology*. Vol. ***1***. Versalovic J. (Ed). ASM, Washington DC, 1122-1143.