

**Indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*) antimikrobás hatásának és
potenciális terápiás lehetőségének vizsgálata pitted keratolysis
bőrfertőzés esetén**

Doktori (PhD) értekezés



Kurdiné Schweitzer Bettina

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: dr. Reglódi Dóra

Programvezető: dr. Kerényi Monika

Témavezető: **dr. Schneider György**

Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT, Pécs

2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
1. A bőr normál flórája.....	8
2. A bőrfelszíni fertőzések rövid áttekintése.....	9
3. A pitted keratolízis.....	10
4. Antibiotikumok és antibiotikum-rezisztencia.....	15
4.1. Antibiotikumok.....	15
4.2. Antibiotikum-rezisztencia és okai.....	16
5. Illóolajok.....	18
5.1. Illóolajok általános jellemzői.....	18
5.2. Illóolaj-történelem.....	20
5.3. Illóolajok antibakteriális hatásmechanizmusa.....	20
5.4. Az indiai citromfű.....	22
5.5. Az indiai citromfű antibakteriális hatása.....	23
3. PITTED KERATOLÍZIS ESETBŐL IZOLÁLT BAKTÉRIUMOK JELLEMZÉSE KLASSZIKUS MIKROBIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL	
1. A tanulmány céljai.....	25
2. Anyagok és módszerek.....	25
2.1. Felhasznált baktériumok, azonosításuk.....	25
2.2. Tenyésztési kondíciók.....	26
2.3. Enzimatiszus tesztek.....	26
3. Eredmények.....	27
3.1. A pitted keratolízisből izolált baktériumfajok identifikálása, jellemzése.....	27
3.2. Enzimatiszus tesztek.....	28
4. ILLÓOLAJ ALAPÚ ANTIBAKTERIÁLIS TESZTEK	30
1. A vizsgálatok céljai.....	30
2. Anyagok és módszerek.....	30
2.1. Baktérium izolátumok és tenyésztési körülmények.....	30
2.2. Felhasznált illóolajok.....	30

2.3. Antibakteriális teszt-kicseppentéses módszer.....	31
2.4. Minimális gátló-és baktericid koncentrációk meghatározása.....	31
2.5. Spóra képzés-gátlás teszt.....	32
3. Eredmények.....	32
3.1. Antibakteriális teszt-kicseppentéses módszer.....	32
3.2. Minimális gátló-és baktericid koncentrációk meghatározása.....	33
3.3. Spóra képzés-gátlás teszt.....	35
5. AZ INDIAI CITROMFŰ ILLÓOLAJ ÖSSZETÉTELE, ANTIBAKTERIÁLIS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA ELVÁLASZTÁSON ALAPULÓ MÓDSZEREKKEL	
1. A tanulmány céljai.....	36
2. Anyagok és módszerek.....	36
2.1. Gázkromatográfia-tömegspektrometria analízis.....	36
2.2. Vékonyréteg kromatográfia-direkt bioautográfia.....	36
2.3. Gőztér szilárd fázisú mikroextrakció körülményei.....	37
2.4. Citrál és α -terpineol antibakteriális hatásának kimutatása kicseppentéses módszer.....	38
2.5. Citrál és α -terpineol MIC és MBC koncentrációinak kimutatása.....	38
2.6. Antibakteriális komponensek kimutatása bioautográfiával.....	38
3. Eredmények.....	39
3.1. GC-MS analízis eredmények.....	39
3.2. Indiai citromfű illóolaj antibakteriális komponenseinek analízise vékonyréteg kromatográfiához kapcsolt direkt bioautográfiával.....	41
3.3. Ismeretlen antibakteriális komponensek azonosítása HS-SPME/GC-MS analízissel.....	42
3.4. Citrál és α -terpineol antibakteriális hatásának kimutatása kicseppentéses módszer.....	42
3.5. Citrál és α -terpineol MIC és MBC koncentrációinak meghatározása.....	43
3.6. Citrál és α -terpineol antibakteriális sajátosságának konfirmálása vékonyréteg kromatográfiához kapcsolt direkt bioautográfiával.....	44

6. INDAI CITROMFŰ ILLÓOLAJAT TARTALMAZÓ KÜLÖNBÖZŐ KENŐCSALAPOK <i>IN VITRO</i> TESZTELÉSE, KIOLDÓDÁSI VIZSGÁLATOK...	46
1. A tanulmány céljai.....	46
2. Anyagok és módszerek.....	46
2.1. Felhasznált kenőcsalapok.....	46
2.2. Antibakteriális tesztek menete.....	46
2.3. Kioldódási kísérletek menete.....	47
2.4. SPME/GC-MS analízis.....	48
3. Eredmények.....	49
3.1. Antibakteriális tesztek.....	49
3.2. Kioldódási kísérletek.....	51
3.2.1. Az indiai citromfű illóolaj fő komponenseinek meghatározása SPME/GC-MS analízissel.....	51
3.2.2. Kenőcs alapok (kontroll) összetételének vizsgálata.....	53
3.2.3. Kenőcsalap + 1% illóolaj komponens összetétele.....	53
3.2.4. A bőrpenetrációs modell eredményei.....	54
7. GÉNEXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSOK	
1. A tanulmány céljai.....	57
2. Anyagok és módszerek	
2.1. A kísérlethez felhasznált baktérium és tenyésztési körülményei.....	57
2.2. Indiai citromfű megfelelő koncentrációjának kiválasztása.....	57
2.3. Eritromycin megfelelő koncentrációjának kiválasztása.....	57
2.4. RNS izolálás.....	58
3. Eredmények	
3.1. Indiai citromfű illóolaj megfelelő koncentrációjának kiválasztása.....	59
3.2. Eritromycin megfelelő koncentrációjának kiválasztása.....	60
3.3. Teljes transzkriptomi analízis eredményei az indiai és kontroll, illetve az indiai citromfű és eritromycin vonatkozásában összehasonlítva.....	61
8. DISZKUSSZIÓ.....	64
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	69
10. MELLÉKLETEK.....	79

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

GC-MS: gázkromatográfia-tömegspektrometria

HS-SPME: Gőztér szilárd fázisú mikroextrakció

IC: Indiai citromfű

LB: Luria Bertani

MIC: minimális gátló koncentráció

MBC: minimális baktericid koncentráció

MH: Müller-Hinton

PK: Pitted keratolízis

TLC: vékonyréteg kromatográfia

TLC-DB: vékonyréteg kromatográfiához kapcsolt direkt bioautográfia

TSA: tripton szója táptalaj

TSB: tripton szója tápfolyadék

WTA: Teljes Transzkriptomi Analízis

1. FEJEZET: Általános bevezetés és célkitűzések

Dolgozatom témája az indiai citromfű illóolaj antimikrobás hatásának vizsgálata, amelyen belül is a pitted keratolízis (angolul Pitted keratolysis), mint bőrfelszíni fertőzés kórokozó ágensei elleni hatásra fókuszálunk. Napjaink egyik legégetőbb közegészségügyi problémája a tradicionális és a terápiában alkalmazott antibiotikumokkal szembeni rezisztencia széleskörű megléte, illetve annak világméretű terjedése. Ez a tény ösztönzi a kutatókat olyan alternatív antimikrobás hatású anyagok keresésére és alkalmazására, melyek alkalmasak lehetnek a különféle humán kórokozók által okozott fertőzések kezelésére (Swamy és mtsai, 2016). E tekintetben a növényekből nyert illóolajok és azok fő kémiai komponensei potenciális antibakteriális ágens jelöltek. Az illóolajok antibakteriális aktivitásuknak köszönhetően gátolhatják a baktériumok növekedését (bakteriosztatikus hatás) vagy okozhatják a baktérium sejt pusztulását (baktericid hatás) (Swamy és mtsai, 2016). Korábbi tanulmányok megerősítik, hogy az indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*) illóolaja és annak fő komponense, a citrál, erős aktivitással rendelkezik gomba- és baktériumfajok széles spektrumával szemben (Naik és mtsai, 2010; Shi és mtsai, 2017). Ezen korábbi irodalmi adatok és egy előzetes szelekció alapján koncentráltunk kísérleteinkben az indiai citromfű illóolajának antibakteriális hatására, megvizsgálva annak lehetőségét, hogy hatékony lehet-e az eddig pitted keratolízissel összefüggésbe hozott fertőző ágensekkel szemben. A pitted keratolízis egy gyakori, bőrfelszíni bakteriális fertőzés, amely a bőr legfelső rétegét, a stratum corneumot érinti, de mint azt korai esetekből ismerjük, előrehaladott állapotban a mélyebb rétegekbe is hatolhat jelentősen befolyásolva ezzel az érintettek életminőségét (Singh és Naik, 2005; Leeyaphan és mtsai, 2019; Bunyaratavej és mtsai, 2018). Ezen lokális fertőzés jellemző tüneteire tartozik a kellemetlen lábszag, majd egyre érzékenyebbé váló érintett terület, amelyen később égő és viszkető érzés tapasztalható, majd akár folytonos fájdalom is megjelenhet (Law és mtsai, 2019). Kezelésére jelenleg antibiotikumokat használnak, amelyek közül a két leggyakoribb szer az erythromycin és a clindamycin. A sikeres terápiát követően gyakran előfordul, hogy a fertőzés nem sokkal a kezelést követően kiújul (Kaptanoglu et al., 2012). Egyes esetekben a sikertelen terápia oka a fenti szerek ellen megjelenő rezisztencia (Leung és Barankin, 2015) vagy éppen a gyors visszafertőződés.

Munkámhoz a vizsgálandó mintát egy 43 éves férfi esete szolgáltatta, akinek mindkét talpán jelen voltak a fertőzésre tipikusan jellemző gödröcskék (pits) és azok összeolvadásából keletkezett kráteres formációk. A fertőzés további tipikus jeleként jelenlevő kellemetlen szag mellett, a páciens irritáló, égő érzésről és viszketésről is beszámolt. A tünetek a nyári meleg

időszakban jelentek meg. Azt is lehet tudni, hogy a páciens zárt cipőt viselt hosszabb időn át. A rendelkezésre álló irodalmi adatokból a fertőzés etiológiai ágenseiről ismereteink ugyan limitáltak, de épp ezen munka során lehetőségünk volt izolálni egy hazai esetből egy, ez eddig a PK-val összefüggésbe nem hozott baktériumfajt, amelynek vizsgálatára munkánk is jelentős mértékben koncentrált. Mivel a fertőzés lokalizációja ideális lehet alternatív antimikrobás, pl. illóolaj alapú kezelések megvalósítására, a jelen munka keretében célul tűztük ki ezen lehetőség körbejárását, melynek didaktikus céljai voltak, hogy:

- azonosítsuk az érintett talpi területekről származó baktériumfajokat és meghatározzuk az etiológiai ágens(ek)e)t,
- megvizsgáljuk az antibakteriális tulajdonságú illóolajok hatékonyságát, oly módon, hogy teszteljük az érintett gödrökből kitenyészett, kórokozó ágensnek valószínűsíthető baktérium izolátumon (*Bacillus thuringiensis*), illetve a pitted keratolízis kiváltásáért felelős törzsgyűjteményi baktériumfajokon,
- alaposabban megvizsgáljuk az egyik leghatékonyabb antibakteriális tulajdonsággal rendelkező, és emellett a *B. thuringiensis* spóráképzését is gátló illóolaj, az indiai citromfű olaj antimikrobás hatását,
- azonosítsuk az indiai citromfű *B. thuringiensis* elleni aktív komponenseit,
- meghatározzuk az indiai citromfű eltérő kenőcs alapokban és eltérő koncentrációban kevert *in vitro* hatékonyságát a pitted keratolízis aetiológiai ágensein,
- bőrpenetrációs modellben meghatározzuk az egyes komponensek eltérő kenőcsalapokból történő kioldódási hatékonyságát.
- teljes transzkriptomi analízissel (WTA) megvizsgáljuk az indiai citromfű illóolaj hatására bekövetkező génextpressziós mintázatváltozását *B. thuringiensis* esetében és összehasonlítsuk azokat az eritromycin jelenlétében bekövetkező változásokkal.

2. FEJEZET: Irodalmi áttekintés

1. A bőr normál flórája

Az emberi bőrfelszín egy komplex életközösséget hordoz, mikrobák széles spektrumának biztosít élőhelyet. Ez a mikroba közösség alkotja szorosabb vagy lazább gazda kölcsönhatásaival az emberi bőr mikrobiomját (Carmona-Cruz és mtsai, 2022). A bőr normál flórája állandó (rezidens) és átmenetileg megtelepedett (tranziens) apatogén baktériumok, penészgombák összessége (Boxberger és mtsai, 2021). Ezek fontosabb képviselőit és lokalizációját az **1. táblázat** (Kemény és mtsai, 2012) tartalmazza.

Az egészséges bőr rezidens flórájának állandó tagjai a koaguláznegatív *Staphylococcus*ok (*Staphylococcus epidermidis*), a diphtheroidok (*Corynebacterium*, *Propionibacterium acnes*), de kimutathatók a hajas fejbőrön, arcon sarjadzó gombák is (*Malassezia furfur*) (Grice és Segre, 2013).

A bőrön átmenetileg előforduló apatogén (penészgombák, *Aspergillus* és *Penicillium* törzsek) és patogén mikrobák (*Staphylococcus aureus*, *Candida* fajok stb.) többnyire a nasopharynxból, genitáliáról, anusból kerülnek a bőrfelszínre, és elsősorban a bőr-nyálkahártya találkozásának közelében telepednek meg. Ezen kórokozók a bőrfelszínt csak időlegesen (napok, hetek) népesítik be, és általában csak kisebb számban mutathatók ki (Kemény és mtsai, 2012).

A bőr, melynek felszíne átlagosan 25m^2 , mindamellett, hogy biotópot biztosít, egyben külső barrierként is szolgál az emberi test és a környezet között (Carmona-Cruz és mtsai, 2022). A bőr mikrobiomnak nélkülözhetetlen szerepe van a bőr homeosztázisának fenntartásában, invazív patogének elleni védelemben és az immunrendszer modulációjában (Sanford és Gallo, 2013; Byrd és mtsai, 2018; Boxberger és mtsai, 2021). A diszbiózis mikrobiális közösségek közötti egyensúly hiányára utal, amely patológiás állapotok létrejöttéhez, betegségek kialakulásához vagy előrehaladásához vezet (McLoughlin és mtsai, 2022). Számos bőrbetegség, mint például atópiás dermatitisz, seborrheás dermatitisz, akne, alopecia areata (foltos hajhullás), pszoriázis egyaránt a diszbiózis eredménye lehet (Sanford és Gallo, 2013; Dréno és mtsai, 2016; Byrd és mtsai, 2018).

1. táblázat: A bőr normálflórája.

Csoport	Mikroba	Lokalizáció
Aerob coccusok	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>M. roseus</i> , <i>M. varians</i>	Minden bőrfelületen, de különösen az intertriginosus területeken
Aerob coryneform baktériumok	<i>Corynebacterium minutissimum</i> , <i>C. lipophilicus</i> , <i>C. xerosis</i> , <i>C. jeikeium</i> , <i>Brevibacterium epidermidis</i>	Intertriginosus területeken (pl. hónalj, inguinalis hajlat, lábujjak között), valamint nedves bőrfelületeken (pl. talpon fokozott lábizzadás esetén)
Anaerob baktériumok	<i>Propionibacterium acnes</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>P. avidum</i>	Faggyúmirigyekben gazdag területeken (homlok, orr)
Gram-negatív baktériumok	<i>Acinetobacter</i> fajok	Axilla, perineum, könyökhajlat területén
Lipofil sarjadzó gomba	<i>Malassezia furfur</i>	Faggyúmirigyekben gazdag bőrfelületeken (homlok, orr) és szőrtüszőkhöz kötötten (pl. fejbőrön)

2. A bőrfelszíni fertőzések rövid áttekintése

A bőr bakteriális fertőzései gyakori betegségek, amelyek vagy akkor alakulnak ki, ha a bőr természetes védekezőkészsége károsodik, és a bőrt kolonizálják a patogén baktériumok, vagy akkor, ha a bőr integritása sérül, és a kórokozók bejutnak a felszíni védőzónák alá. Bőrfertőzések kialakulására környezeti tényezők, nem megfelelő higiénés állapot, valamint szisztémás betegségek (diabetes, csökkent immunkompetencia) hajlamosítanak. A fokozódó antibiotikum-rezisztencia és a polirezisztens bakteriális törzsek hordozása miatt a kórképek jelentősége növekszik (Kemény és mtsai, 2012). Ezek közül a leggyakoribbak:

Az **impetigo**, amely egy rendkívül fertőző, felszíni bőrfertőzés, ami leggyakrabban 2-5 éves gyermekeket érint. Legfontosabb kórokozója a *Staphylococcus aureus*, de előfordulhat, hogy

Streptococcus pyogenes áll a fertőzés háttérében egyedül vagy *S. aureus* baktériummal társulva (Cole és Gazewood, 2007).

A **Staphylococcus leforrázott bőr szindróma** a bőr egybefolyó felszíni hámlása, ami általában újszülötteknél és fiatal gyermekeknél fordul elő és a fertőzést okozó törzsek által termelt toxin váltja ki (Motswaledi, 2011).

A **folliculitis**-nak is létezik felszíni formája, attól függően, hogy a szőrtüsző milyen mértékben érintett. Leggyakoribb kórokozója a *S. aureus* (Laureano és mtsai, 2014).

Az ún. **intertrigo** az intertriginosus régiókban (összefekvő bőrterületek) krónikus irritáció és a bőr rezidens mikrobáinak elszaporodása miatt alakul ki. Előfordulását tekintve gyakoribb forró és párás környezetben és nyáron. A bőrhajlatok, főleg a mellék alatti és a farpofák közötti területek, hónalj és az ujjak közötti területek lehetnek érintettek. Fizikai vizsgálatok rendszerint hámló szélekkel rendelkező erythema-t mutatnak. A fertőzés leggyakrabban túlsúlyos; cukorbeteg; HIV fertőzött vagy ágyhoz kötött betegek esetén figyelhető meg (Kalra és mtsai, 2014).

Az **erythrasma** combhajlatban vagy hónaljárokban kialakuló éles szélű, barnás, barnásvörös, hámló foltként jelentkező felületes bőrgyulladás. Az erythrasmat corynebacteriumok, elsősorban *C. minutissimum* elszaporodása okozza. A kórképre diabetes, elhízás és fokozott izzadás hajlamosít (Riquelme és Moyano, 2021).

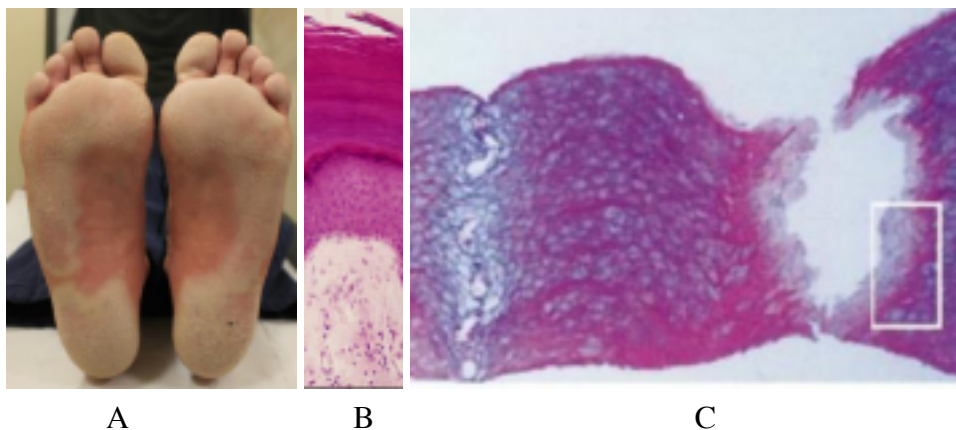
A **trichobakteriózis** fertőzést a *Corynebacterium tenuis* okozza, mely sárgásbarna, vöröses vagy feketés lepedéket alkot a megvastagodott, sárgásan elszíneződött szőrszálakon (hónalj, ritkábban genitális szőrzet). Hajlamosító tényező a fokozott izzadás és a hiányos személyi higiéné (Pinto és mtsai, 2016).

A micrococcosok vagy corynebacteriumok jelenléte és metabolikus aktivitása révén kialakuló féregrágásszerű macerációk, gödrök (pit) elsődleges kiváltó tényezője a bakteriális expozíció mellett az izzadás. A kórkép a **pitted keratolysis** vagy további elnevezésekkel **keratolysis plantare sulcatum** (Tilgen, 1979), **keratoma plantare sulcatum** (Castellani, 1910), illetve **ringed keratolysis** (Zaias, 1982). Dolgozatomban a továbbiakban a pitted keratolízis elnevezést vagy PK megjelölést használom.

3. A pitted keratolízis

A pitted keratolysis (PK) egy szerzett, krónikus, rendszerint tünetmentes, nem gyulladós, felszíni bakteriális fertőzés, amely a bőr legkülső rétegét, a stratum corneumot érinti. Kezdetben nem összefüggő felszíni bemarkódások jellemzik, melyek később krátterszerű kiterjedtebb gödrökké olvadhatnak össze (**1. ábra**). Rendszerint a talp nyomásnak kitett

részein fordul elő, habár jóval ritkábban, de a tenyereken is megjelenhet (Singh és, Naik, 2005). A fertőzés minden korosztályt érinthet, azonban sokkal gyakoribb serdülőkorban és fiatal felnőtteknél, valamint férfiak esetén (Leung és Barankin, 2015). A legérzékenyebb tünet a kellemetlen lábszag. Ennek oka, hogy tünetek kiváltására képes jelenlevő mikroorganizmusok proteáz enzimeket termelnek, amelyek elkezdik emésztetni a keratint és ezzel oldani a stratum corneum réteget. Az emésztés melléktermékeiként keletkeznek azon illékony kénvegyületek (tiolok, szulfidok, tioészterek), melyek jellegzetes szagot eredményeznek (Leung és Barankin, 2015). A bemaródások és a fokozódó kellemetlen szag mellett idővel a terület érzékennyé válik és viszketni kezd.



1. ábra: A pitted keratolízis makro- és mikroszkópikus képe. A PK megnyilvánulása a talpak nyomásnak kitett részein (A). Ép bőr szerkezete (B). A stratum corneum PK hatásra történő bemaródással (C).

Az első esetleírások az indokínai régióból származnak és szorosan összefüggnek a trópusi klímával, a mezítláb történő járással. A tüneteket elsősorban a helyi lakosság körében figyelték meg, de két leírt esetet találtunk, amely európaiakat érintett. Mindkét esetben hajós tisztokról volt szó, akik India különböző kikötőiben ellenőrizték a hajók fedélzetének tisztítását. Ezt az ellenőrzést mezítláb végezték (Acton és McGuire, 1931).

Az utóbbi években került publikálásra néhány tanulmány, ahol napjaink PK-s eset előfordulásokat írtak le és ezzel valamelyest adatot szolgáltatnak PK epidemiológiájára vonatkozóan. A tüneteket megfigyelték többek között a zárt cipőt használó egyéneknél (például atléták, tengerészek, katonák) (Kaptanoglu és mtsai, 2012), idős kórházi betegeknél (Stollsteiner és mtsai, 2016), árvízzel érintett területek lakóinál (legtöbbször a fejlődő, szegény közösségekben a párás, trópusi országokban) (Dhitavat és mtsai, 2012). De az utóbbi időben leírásokat találunk nemcsak az agráriumban dolgozó és gyári munkások köréből, hanem irodai dolgozók esetében is (Kaptanoglu és mtsai, 2012). Ez összehozható a zárt cipő viseléssel és az

abból, illetve egyéb élettani okokra visszavezethető izzadásra, de fogékonyságot növelő faktorok közé tartozik emellett a bőr pH-jának növekedése, a nem megfelelő láb higiénia, elhízás és egyes immunhiányos állapotok is (Leung és Barankin, 2015).

Annak ellenére, hogy a legutóbbi tanulmányok ezen fertőzés széles elterjedtségére utalnak, csak kevés leírás foglalkozik maguknak a kórokozó ágenseknek az azonosításával, ami annál is érdekesebb, mivel több esetben számoltak be terápiás kudarcokról, illetve esetkiújulásokról (Kaptanoglu és mtsai, 2012; Kim és mtsai, 2005). Ez azért lenne érdekes, mivel felveti az antibiotikum rezisztencia kérdését vagy a kórokozó ágens valamilyen más módon történő túlélését a léziókban. Mindössze négy korábbi publikációt említhetünk, amelyekben konkrét fajokat, de legalábbis szűkebb baktérium csoportokat jelöltek meg etiológiai ágensekként. Ezek a *Kytococcus* (korábban *Micrococcus*) *sedentarius*, *Corynebacterium* fajok, *Dermatophilus congolensis*, *Actinomyces keratolytica* és *Streptomyces* fajokat hozták összefüggésbe a leírt esetekkel kapcsolatban (Leung és Barankin, 2015).

A *K. sedentarius* eredendően környezetben előforduló baktériumfaj, amelyet mindössze két ízben írtak le mint a PK kórokozóját (Chaudhary és Finkle, 2010; Longshaw és mtsai, 2002). A *Kytococcusok* Gram-pozitív, pigmentált, tokot nem képző, sok esetben tetrádos térbeli elrendezést mutató, mozgásra képtelen, aerob, kataláz-pozitív coccusok (Chan és mtsai, 2012). Ezt a baktériumot először 1944-ben izolálták tengeri környezetből (ZoBell és Upham, 1944), de törzsei gyakran kerültek izolálásra emberi bőrről is (Kloss és mtsai, 1974).

A *Corynebacteriumok* a természetes bőr életközösség közel 50 %-át teszik ki (Kazmierczak és mtsai, 2005). Ez a baktérium család felelős a pitted keratolízisért, trichobakterióziséért, és az erythrasma kialakulásáért (Shelley és Shelley, 1982; Heid és mtsai, 1994). A gombás fertőzésekkel szemben nincs bizonyíték exogén kontaminációt illetően. Úgy tűnik, csakis a helyi környezeti változások kedveznek a kommenzalizmusból eredő fertőzéseknek. A meleg és nyirkos környezet (szellőztetés hiánya) gyakori rizikófaktora a fent említett fertőzések kialakulásának (Hartmann, 1990).

A *D. congolensis* egy aerob és fakultatív anaerob Gram-pozitív pálcá (Alejo-Cancho és mtsai, 2015). Ez a baktérium a dermatofilózis nevű bőrfertőzés kórokozó ágense, mely betegség rendszerint –pl. kullancsfertőzés (*Amblyomma variegatum*) hatására- immunszupresszált állatokat érint, főleg marhákat. Egész világra kiterjedő eloszlású és rendszerint párás környezetben találkozhatunk vele. Emberek megfertőződése a fertőzött állatokkal történő kontaktus révén lehetséges (Burd és mtsai, 2007).

Bergey az *Actinomyces* nemzetséget sok elágazó micélium formájában növekvő organizmusként definiálta 1930-ban. Ezek a micéliumok szegmensekre oszthatnak, melyek konídiumokként funkcionálnak (Acton és McGuire, 1931). Az *Actinomyces* fajok anaerob Gram-pozitív baktériumok, melyek normál esetben az emberi szájüreget, gyomor-béltraktust és a húgyivarszervi traktust kolonizálják. Lassú növekedés jellemző rájuk (Valour és mtsai, 2014).

A *Streptomyces* fajok a környezetben széleskörben fordulnak elő, mély vízű tengerektől a magashegységig bárhol találkozhatunk velük (Waksman és mtsai, 2010; Sarmiento Vizcaíno és mtsai, 2018; Ribeiro da Cunha és mtsai, 2019). Jellemzőjük, hogy spóra-képző, fonalas felépítésű, Gram-pozitív baktériumok, amelyek az *Aktinobaktériumok* csoportjába tartoznak (Quinn és mtsai, 2020).

A fenti baktériumok közös vonása, hogy tipikusan környezeti fajok, illetve csoportok és emellett izolátumaik erős proteolitikus enzimekkel rendelkezhetnek. Kolonizációjuk után a külső réteg enzimatikus bontását követően a továbbiakban megteremtik a lehetőséget más környezeti baktériumok számára is, hogy kolonizálják az érintett területet és esetlegesen mélyebb fertőzéseket, adott esetben lokális fekélyeket, esetleg szepszist váltsanak ki. Néhány ilyen extrém esetleírással találkozhatunk az indokínai területekről származó angol leírásokban (Dhitavat és mtsai, 2012), illetve egy 1983-ból Nepálból származó 20 éves farmert érintő esetleírással (Sehgal és Ramesh, 1983), ahol az extrém módon előrehaladott a fekélyesedés az érintett területek érzéketlenségével is járt (**2. ábra**).



2. ábra: A pitted keratolízis szokatlan klinikai megnyilvánulása.

Manapság a fertőzés kezelése antibiotikum tartalmú kenőcsök lokális használatán alapul, amelyekre az erythromycint, tetracyclint és clindamycint használják. Lévén a fertőzést gyakran gombás fertőzésként félrediagnosticszizálják, ezért a terápiához sokszor tévesen valamilyen antifungális szert, mint clotrimazolt vagy miconazolt írnak fel, amely emiatt kudarcra van ítélve (Zaias, 1982). Antibiotikumok mellett hatékony lehet dezinficiáló szerek alkalmazása. A benzoyl peroxid viszonylag gyakran használt szer ezen kategóriában köszönhetően antimikrobiális-, szárító- és hámlató tulajdonságainak (Leung és Barankin, 2015). A fertőtlenítők közül gyakorlatilag a glutáraldehid és formaldehid is használható (Zaias, 1982), de ezen szerek toxikusak az eukarióta sejtekre is. Krónikus esetekben javallották a szájon át alkalmazandó antibiotikum alapú terápiát (clindamycin és erythromycin) (Leung és Barankin, 2015), de ezek használata kerülendő lévén hatásukat nem csak lokálisan fejtik ki, hanem a testszerte előforduló baktériumokra egyaránt hatnak.

A terápiás próbálkozások során leírt kudarcoknak (Kaptanoglu és mtsai, 2012; Kim és mtsai, 2005) két oka lehet, a korábban már említett (i) félrediagnosticszizálás és az ebből eredő nem megfelelő antibiotikum használat, illetve a (ii) rezisztencia az alkalmazott szerrel szemben. A rezisztens esetek mellett a másik problémát a fertőzés kiújulása jelenti. Egy tanulmányban (Kaptanoglu és mtsai, 2012) 41 PK esetet vizsgáltak és kezeltek, mely páciensek többsége irodai dolgozó volt magas társadalmi-gazdasági státusszal, egyetemi végzettséggel. A páciensek közül 13 rendszeresen és hosszú időn keresztül viselt zárt cipőt munkája során. Kezelésüket aszerint tervezték meg, hogy milyen volt a léziók klinikai megjelenése, anatómiai kiterjedése, a gödröcskék hiperkeratózisa és mélysége. A **2. táblázat** (Kaptanoglu és mtsai,

2012) mutatja az alkalmazott kezeléseket.

2. táblázat: PK-val diagnosztizált páciensek tünetei és alkalmazott kezelése.

Alkalmazott kezelés	Páciensek	Tünet
4 %-os eritromycin gél	a páciensek 21,9 %-a	kellemetlen szag, apró gödröcskék
helyi kezelés + roxytromicin antibiotikum	a páciensek 78,1 %-a	kellemetlen szag, mély léziók és fellazulás
10 %-os szalicilsav + eritromycin gél	a páciensek 46,4 %-a	kellemetlen szag, mélyebb léziók
0,01 %-os KMNO ₄		súlyos maceráció

A kezelések 1-8 hétig tartottak. A kezelési időtartam alatt a páciensek pamut zoknit viseltek, illetve nem viselték ugyanazt a cipőt két egymást követő napon. A rákövetkező egy év alatt a páciensek 17 %-ában történt kiújulás (Kaptanoglu és mtsai, 2012).

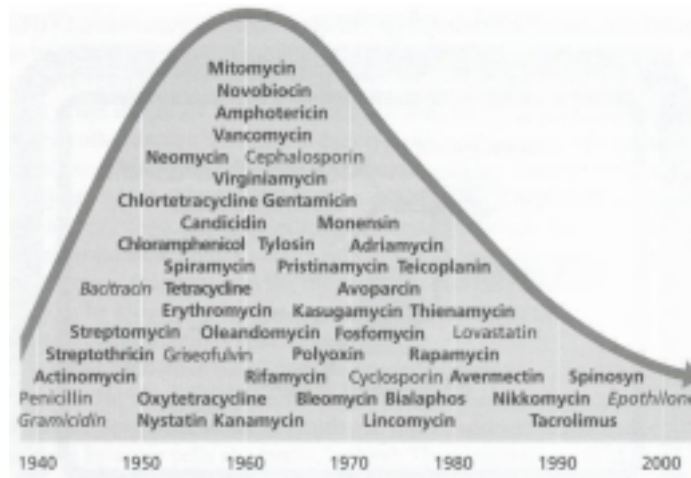
A tanulmány érdekes jelenségre világít rá, de nem informatív arra vonatkozóan, hogy mely mikrobiológiai ágens jelenlétéhez volt köthető a fertőzés megléte és adott esetben a tünetek kiújulása.

4. Antibiotikumok és antibiotikum-rezisztencia

4.1. Antibiotikumok

Az antibiotikumok olyan szerek, amelyek a mikroorganizmusok egyes csoportjait képesek előlni vagy azok életfunkcióit és ennek következtében szaporodását gátolni. Hatásukat különböző módon képesek kifejteni. A legszélesebb körben alkalmazott antibiotikum család a penicillinek. Felfedezése Alexander Fleming nevéhez köthető aki 1928-ban realizálta, hogy a *Penicillium* nemzetségbe tartozó penész képes olyan anyagot kiválasztani, mely gátolja a mellette lévő baktériumok növekedését. Megfigyeléséből 1944-re lett ipari mértékekben is előállítható terápiás szer. Ezen idő alatt azonban számos új antimikrobás hatású szer került felfedezésre mely lendület töretlenül tartott az 1960-as évekig, majd egy hanyatló tendenciával

majd teljesen lefékeződött az ezredfordulóra (3. ábra).



3. ábra: Új antibiotikumok felfedezésének tendenciája az 1940-es évektől az ezredfordulóig tartó időszakban.

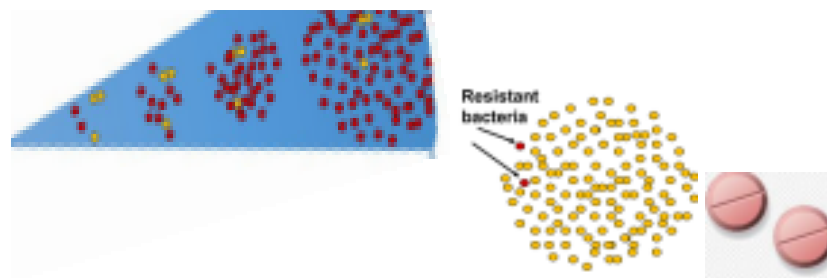
Hatásmechanizmusát tekintve az antibiotikumok lehetnek sejtfa-szintézist gátlók (béta laktámok és glikopeptidek), fehérje-bioszintézist gátlók (aminoglikozidok, tetraciklinek, kloramfenikol, makrolidok, oxazolidinonok), DNS replikációt gátlók (quinolonok) és folsav metabolizmust gátlók (szulfonamidok és a Trimetoprim) (Kapoor és mtsai, 2017). A fokozott és sok esetben indokolatlan antibiotikumhasználat következtében mára számos mikroorganizmus esetében alakult ki antibiotikumrezisztencia ezzel szűkítve a kezelésben használható szerek spektrumát.

4.2. Antibiotikum-rezisztencia és okai

Az antibiotikumok túlzott mértékű használata rezisztencia kifejlődéséhez vezet (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Read és Woods, 2014). Járványtani tanulmányok igazolják a közvetlen kapcsolatot antibiotikum felhasználás és a rezisztens baktériumtörzsek elterjedése között (The antibiotic alarm, 2013). A rezisztencia gének baktériumról baktériumra történő átadása történhet öröklés útján (vertikális géntranszfer), illetve környezetből (transzformáció) vagy más baktériumoktól történő génfelvétel útján horizontális géntranszfer segítségével. Ez utóbbi folyamat közvetlen génfelvétellel, transzformációval, plazmid vagy egyéb mobilis genetikai elemek közvetítésével konjugációval, illetve bakteriofágok révén transzdukcióval valósulhat meg.

A horizontális géntranszfer nagyon hatékony evolúciós lehetőséget biztosít, hiszen ezek a mechanizmusok lehetővé teszik az antibiotikum rezisztencia átvitelét baktériumok különböző

fajai között is. Az antibiotikumok jelenléte evolúciós nyomásként hathat, ami emellett spontán mutációt is eredményezhet. Az evolúciós nyomás hatására az antibiotikum-rezisztencia elterjed a jelenlévő populációban, így a folyamat a rezisztens baktériumok, baktériumgének feldúsulását eredményezi (Read és Woods, 2014). Ez a folyamat bárhol lejátszódhat, legyenek azok az agrárium egyes területei, a humán alkalmazások, vagy éppen a természeti környezet (4. ábra).



4. ábra: Az evolúciós nyomás szerepe az antibiotikum-rezisztencia terjedésében egy adott populáción belül.

A vázolt folyamat két legfontosabb hajtóereje az antibiotikumok túlzott mértékű mezőgazdasági használata, illetve azok humánterápiás célzatú indokolatlan felírása és kontroll nélküli használata (The antibiotic alarm, 2013; Centers for Disease Control and Prevention, 2013). Számos tanulmány vizsgálta az antibiotikum-rezisztencia kórházi előfordulását, illetve annak terjedését és kimutatta, hogy a kezelés indikációja, az ágens megválasztása, vagy az antibiotikum terápia időtartama az esetek 30-50%-ában nem megfelelő (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Luyt és mtsai, 2014). A terápia megkezdése előtt fontos lenne a kórokozó ágens, illetve annak antibiotikum érzékenységi profiljának megállapítása. Ezzel szemben egy amerikai tanulmányban a vizsgált 17.435 páciens mindössze 7.6%-ában tudták azonosítani a patogént közösségben szerzett tüdőgyulladás esetén (Bartlett és mtsai, 2013).

Ezzel szemben, a Karolinska Intézet kutatói Svédországban azonosították a lehetséges kórokozót a páciensek 89%-ában molekuláris diagnosztikai technikák segítségével (PCR) (Bartlett és mtsai, 2013). A helyzet az intenzív osztályokon felírt antibiotikumok esetében sem jobb, igaz itt gyakran gyorsan kell dönteni és nincs idő antibiotikum profil előzetes vizsgálatára. Egy nemrégiben született adat alapján 30-60%-ban bizonyultak szükségtelennek, nem megfelelőnek vagy szuboptimálisnak az intenzív terápiás intézetekben alkalmazott antibiotikum dózisok (Luyt és mtsai, 2014). A nem helyesen alkalmazott antibiotikumok terápiás hatása kérdéses, illetve kiteszi a pácienseket az antibiotikum terápia lehetséges komplikációinak (Lushniak, 2014).

Szubinhibítorikus és szubterapeutikus antibiotikum koncentrációk elősegíthetik az antibiotikum rezisztencia kifejlődését a genetikai módosulások által (génexpressziós változások, horizontális géntranszfer, mutagenézis) (Viswanathan, 2014). A változások az antibiotikum által indukált génexpresszióban képes növelni a virulenciát, míg növekvő mutagenézis és horizontális géntranszfer elősegíti az antibiotikum rezisztencia megjelenését és a terjedést (Viswanathan, 2014). Antibiotikumok alacsony szintjei például hozzájárultak törzs diverzifikációhoz (*Pseudomonas aeruginosa*), illetve pl. *Bacteroides fragilis* esetében piperacillin és/vagy tazobactam szubinhibítorikus koncentrációi szintén indukáltak fehérje módosításokat (Viswanathan, 2014).

Antibiotikumok tömeges és sokszor szükségtelen használata a velük szembeni rezisztencia kialakulásának, fenntartásának veszélyét eredményezi, mint ahogy azt számos elsősorban kórházi tanulmány reprezentálja (Agyeman és mtsai, 2022). Napjaink egyik legnagyobb egészségügyi kihívása azon baktériumok fokozott mértékű terjedése, melyek nem csak egy egy antibiotikummal szemben rezisztensek, de számos antibiotikummal szemben. Ezen multidrog rezisztens (MDR) kórokozók közé tartoznak a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* stb. Ezen baktériumok tipikusan a kórházi kórokozók csoportját alkotják, de ezek kijutva a társadalomba és a környezetbe új utat nyitnak a rezisztencia gének terjedésének és ezzel környezeti antibiotikum rezisztens kórokozók kialakulásának is.

Egyik lehetőség ezen fenti folyamat fékezésére olyan új antimikrobás szerek alkalmazása – ahol erre lehetőség van-, melyek nem növelik tovább az antibiotikumok környezetbe való kijutását és ezzel nem fokozzák a környezeti mikrobákra gyakorolt és terjedő antibiotikum rezisztencia irányába mutató evolúciós nyomást. Egyik lehetséges opciót az illóolajok alkalmazása nyújthatja, amelyek antimikrobás hatásuk révén legegyszerűbb megközelítésben felszínen alkalmazva ideális opcióként szolgálhatnak.

5. Illóolajok

5.1. Illóolajok általános jellemzői

Az illóolajok növényi kivonatok, melyek ugyan nem szigorú értelemben vett olajok, de összetételük miatt általában nehezen oldódnak vízben, az olajokhoz hasonlóan (Calo és mtsai, 2015). A természetben fontos szerepet játszanak a növények védelmében, mint antibakteriális, antivirális, antifungális ill. rovarok elleni repellens szerek. Sokukat kellemes illatuk révén

jelentős mennyiségben használja a fűszer- és illatszeripar (Calo és mtsai, 2015). Jelenleg körülbelül 3000 illóolaj ismert, ebből nagyjából 300 fontos kereskedelmi szempontból (főként a fűszer- és illatszer piacon) (Van de Braak és Leijten, 1999). Az illóolajok különféle növényi részekből nyerhetők, mint pl. levelekből, kéregből, szárból/törzsből, gyökérből, virágokból és gyümölcsökből. Kinyerésükre több módszer létezik, amelyek közül a leggyakoribbak a desztilláció (gőzdesztilláció), sajtolás, extrahálás vagy akár a szuperkritikus CO₂ extrakció.

Az illóolajok komplex összetételű természetes keverékek. Általában 20-60 komponens meghatározása a tipikus, de az alkalmazott műszer megfelelő érzékenysége esetén egy-egy növényi kivonatból akár 400-500 komponens meghatározás is lehetséges (Atanasova és mtsai, 2016). Kémiai összetételüket tekintve a jelentősebb csoportok a terpének (mono-, szeszkvi- és diterpének), alkoholok, savak, észterek, epoxidok, aldehidek, ketonok, aminok és szulfidok. Ezen komponensek valójában két fő csoportra oszthatók: terpén komponensekre és aroma komponensekre (Calo és mtsai, 2015). Különösen a fenol komponensek (aromás vegyületek) felelősek az antibakteriális tulajdonságért (Burt, 2004).

Az illóolajokat két vagy három fő komponens jellemzi meglehetősen magas koncentrációban (20-70%), összehasonlítva egyéb komponensekkel, melyek kis mennyiségben vannak jelen. Az előbbiek a fő vagy major komponensek, míg az utóbbiak a minor komponensek. Általánosságban a főkomponensek határozzák meg az illóolajok biológiai tulajdonságait (Bakkali és mtsai, 2008).

Az illóolajok összetétele számos tényezőtől függ. Meghatározó ebben, hogy a növénynek melyik részéből származnak, hiszen az egyes komponensek aránya, vagy éppen megléte eltérő a virág, a zöld részek (levelek, szár/törzs), kéreg, gyümölcs, a magház, mag, vagy a gyökér tekintetében (Novak és mtsai, 2005; Olawore és mtsai, 2005). Az illóolajokról úgy tartják, válaszként termelődnek a növényekben bizonyos stresszorok hatására, ezért a növekedési körülmények is hatással lehetnek a hozamra és az illóolaj tartalomra (Theis és Lerda, 2003).

Azt is lehet tudni, hogy a termesztési hely nem befolyásolja jelentősen az összetételt, a betakarítás ideje viszont igen. Például kakukkfű esetén maximális illóolaj hozam és thymol tartalom akkor nyerhető, ha a növények ~15 cm-re vannak ültetve egymástól és a begyűjtés a virágzás elején történik (Badi és mtsai, 2004). Számos paraméter befolyásolja továbbá a hozamot és az összetételt. Ilyenek például a szárítási módszerek és kinyerési eljárások. Egy kutatásból kiderül, hogy eukaliptusz növényenél az árnyékban szárított minták eredményezik a legtöbb illóolajat, a kinyerési módszerek közül pedig a hidrodessztilláció bizonyul a legjobbnak. Viszont, az eukaliptusz fő komponensének aránya akkor a legmagasabb, ha víz-

vagy gőzdesztillációval történik a kinyerés (Fathi és Sefidkon, 2012).

5.2. Illóolaj-történelem

Habár a fűszereket az ókor óta használjuk az illatuk, ízesítő és tartósító tulajdonságaik miatt (Bauer és mtsai, 2001), csak a terpentint említik a görög és római történészek (Guenther, 1948). A desztillációt először Keleten használták (Egyiptom, India és Perzsia) (Guenther, 1948) több, mint 2000 évvel ezelőtt és a 9. században az arabok fejlesztették tovább (Bauer és mtsai, 2001). Az első írásos beszámoló az illóolaj-desztillációról Villanova, katalán fizikus nevéhez köthető (~1235-1311) (Guenther, 1948). A 13. századtól az illóolajokat a gyógyszertárak készítették és gyógyszer-tani hatásukat gyógyszerkönyvekben jegyezték fel (Bauer és mtsai., 2001), de használatuk nem terjedt el széleskörűen Európában a 16. századig, ettől az időtől kezdve Londonban forgalmazták (Crosthwaite, 1998).

Ebben az évszázadban egymástól függetlenül publikálták az illóolajok desztillációját és használatát két strassburgi fizikus, Brunshwig és Reiff, de viszonylag kisszámú illóolajat említve: terpentín, borókafa, rozsmaring, levendula, szegfűszeg, szerecsendió, ánizs és fahéj (Guenther, 1948).

A francia fizikusnak, Du Chesne-nek (Quercetanus) köszönhetően a 17. században az illóolajok kinyerése jól ismert volt és a gyógyszertárak általában 15-20 különböző olajat tartottak készleten (Guenther, 1948). A teafa illóolajának gyógyászati célokra történő használata Ausztrália gyarmatosítása óta ismert (18. század vége), habár ezelőtt a bennszülött ausztrálok használták (Carson és Riley, 1993). Az illóolajok baktericid tulajdonságainak elsőkérdéses mérését De la Croix kivitelezte 1881-ben (Boyle, 1955). Azonban a 19. és 20. században az illóolajok használata az orvoslásban fokozatosan másodlagossá vált (Guenther, 1948).

Az illóolajok számos biológiailag aktív anyagot tartalmazhatnak, amelyek képesek lehetnek mind az eukarióta, mind a prokarióta sejtek funkcióinak befolyásolására. Ezen ismert hatások alapján mindamellett, hogy az illóolajok befolyásolhatják a tumoros sejtek, az idegrendszer működését, rendelkezhetnek antivirális, antifungális és antibakteriális hatással is.

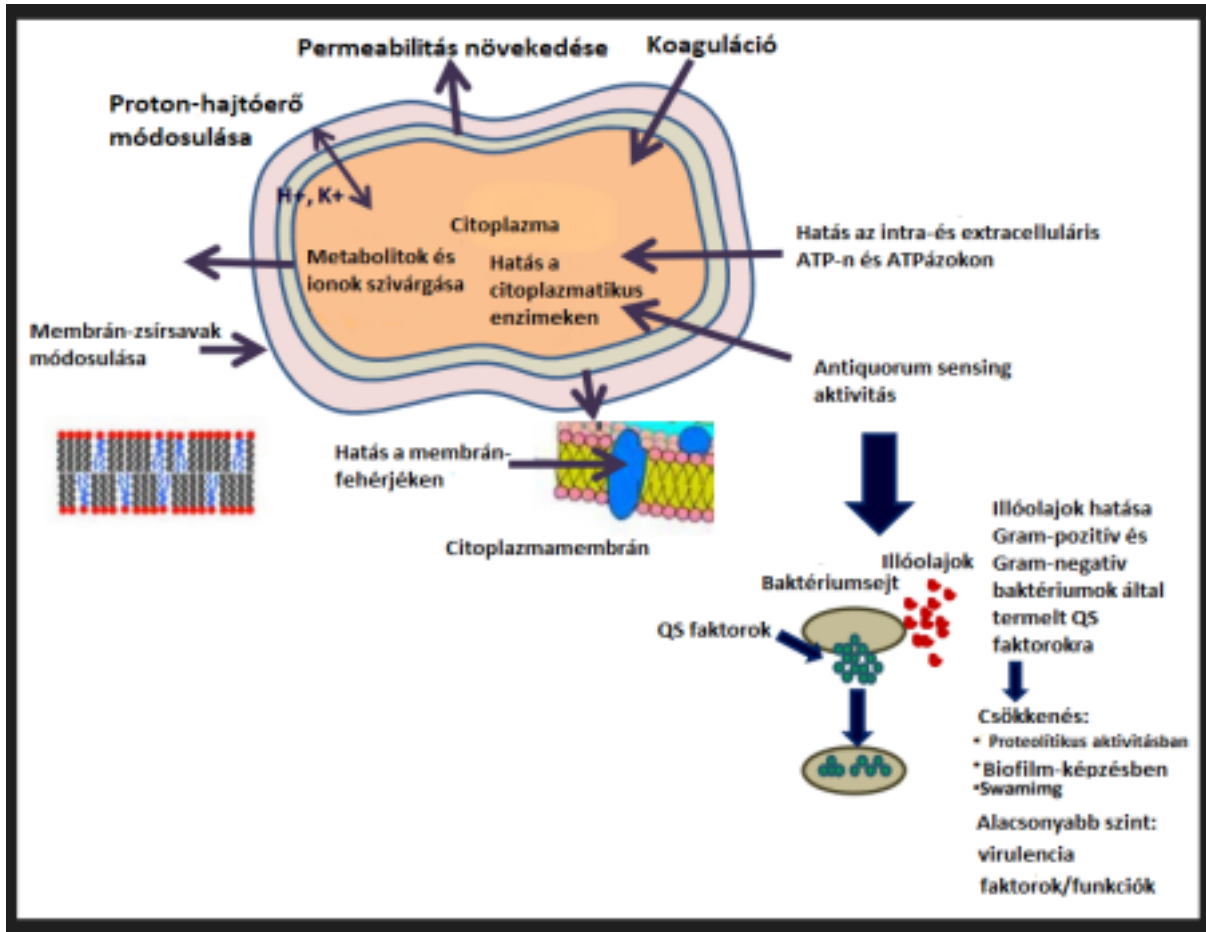
5.3. Illóolajok antibakteriális hatásmechanizmusa

A mind szélesebb körben terjedő antibiotikumrezisztencia az utóbbi időben egyre fontosabb tényezővé tette az illóolajok antimikrobás hatásának vizsgálatát. Ma már tudjuk, hogy az

egyres komponensek aktivitása egyaránt hatással lehet a sejt külső felszínére és a citoplazmában zajló enzimatikus folyamatokra. Az illóolajok hidrofobicitása felelős a bakteriális struktúrák megbontásáért, ami megnövekedett permeabilitáshoz vezet. A permeabilitási barrier, amit a sejtmembránok biztosítanak, számos sejtfunkcióhoz nélkülözhetetlen: a sejt energia állapotának fenntartásához, membránhoz kapcsolt energia-átalakító folyamatokhoz, oldott anyagok transzportjához és az anyagcsere szabályozásához. A sejtmembrán ezen kívül nélkülözhetetlen a turgornyomás szabályozásához. Az illóolajok hatásmechanizmusa magába foglalja a sejtfa degradációját, a citoplazma membrán károsítását, citoplazma koagulációját, a membránfehérjék károsítását, megnövekedett permeabilitást (sejttartalmak szivárgásához vezet), proton-hajtóerő csökkenését, az intracelluláris ATP-készlet csökkenését (csökkentett ATP szintézis és megnövelt hidrolízis útján), a membránpotenciál csökkenését a megnövekedett membrán permeabilitáson keresztül.

Az illóolajok hidrofób természete lehetővé teszi a sejtbe történő penetrációjukat és azt, hogy módosításokat okozzanak mind a sejt struktúrájában, mind a működésében. Ez magyarázhatja, hogy az illóolajok miért hatásosabbak általában a Gram-pozitív mikroorganizmusokkal szemben (néhány Gram-negatív baktérium külső rétege gátolja vagy megelőzi az illóolajok penetrációját a sejtbe). Az illóolajok komponensei képesek a sejtfaiban lévő fehérjékkel is kapcsolatba lépni, mely fehérjék gyakran nélkülözhetetlen molekulák sejtbe történő transzportjában vesznek részt. Mások a membrán permeabilitásra hatnak és ezzel az elektron transzport rendszert is tönkreteszik. Ilyenek a karvon, timol, karvakrol. Az elektrontranszport gátlása, a proton-hajtóerő, protein transzlokáció, sejtes komponensek szintézisének megszakítása mind olyan fiziológiai változások, melyek a sejt lízisét és halálát eredményezhetik. Amikor a mikroorganizmusok környezetében antimikrobiális anyagok vannak jelen, a baktériumok reagálhatnak úgy, hogy a zsírsavak és membránfehérjék szintézisét módosítják, ezzel megváltoztatva a membránfluiditást. A membrán permeabilitás módosulása és a molekulák ill. ionok transzportjában történő defektusok a mikrobiális sejtben belüli egyensúly felborulását eredményezik. Ezt követően citoplazma-koaguláció, számos enzim és sejtes fehérje denaturációja, ill. metabolitok és ionok elvesztése következik be. Illóolajok vagy más antimikrobiális komponensek szubletális koncentrációjában a mikroorganizmusokban stressz-válasz fehérjék expressziója indul meg, hogy helyreállítsa a károsodott fehérjéket. Abban az esetben viszont, ha az antimikrobiális szer magasabb koncentrációban van jelen, a mikroorganizmusok ezen válaszreakciója nem képes megelőzni a sejt halálát. Mivel molekulák széles választéka található meg egy adott kivonatban, az

illóolajok antimikrobás aktivitása nem köthető csupán egyetlen mechanizmushoz (Nazzaro és mtsai, 2013). Különböző biokémiai és strukturális mechanizmusok játszódnak le a sejten belül és a sejtfelszínen, mely lehetséges targetek az **5. ábrán** láthatóak.



5. ábra: Illóolajok komponenseinek főbb célpontjai a mikrobiális sejteken (Nazzaro és mtsai, 2013).

5.4. Az indiai citromfű

Az indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*, LG), trópusi és szubtrópusi élőhelyeken terem (Cheel és mtsai, 2005). Felhasználása széles körben elterjedt. A növényt főzéshez, italok és teák elkészítéséhez használják, illetve a hagyományos kínai orvoslásban is alkalmazzák magas vérnyomásra és diabéteszes egyéneknél (Campos és mtsai, 2014). Általános biológiai hatások tekintetében vannak publikációk, melyek az indiai citromfű fertőzést gátló (antiszeptikus), lázcsillapító, szélhajtó (karminatív), nyugtató és gyomorerősítő hatásáról számolnak be (Fernandes és mtsai, 2012), valamint arról, hogy illóolaja relaxáló hatású és segíthet az izmok erősítésében, az izomfájdalmak és a reuma enyhítésében (Meenapriya és Priya, 2017). Ezek tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel. Az indiai citromfű fungicid és baktericid hatására vonatkozóan viszont számos tanulmány jelent már meg (Gardner és McGuffin,

2013; Vazirian és mtsai, 2012; de Bona da Silva és mtsai, 2008).

5.5. Az indiai citromfű antibakteriális hatása

Az indiai citromfűből kinyert illóolaj antibakteriális hatását különböző baktérium fajokkal szemben vizsgálták és igazolták, mint például az *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Corynebacterium equii*, *Staphylococcus aureus* (Hammer és mtsai., 1999; Aiemsaard és mtsai, 2011; Friedman és mtsai, 2002; Maizura és mtsai, 2008).

Az antimikrobás hatás vizsgálatára több módszer is létezik. A legegyszerűbb és éppen ezért a legelterjedtebb a drop plate módszer, illetve ennek azon változata, ahol az illóolajat, hasonlóan az antibiotikum korongokhoz szűrőpapírra itatják és az így nyert szűrőpapír korongot helyezik a frissen szélesztett baktériumgyepre. Szintén diffúzió alapszik az agar lemez-diffúziós módszer (Balouiri és mtsai, 2016), mely során az antimikrobiális ágens az agarba diffundál és gátolja az agarba kevert teszt-mikroorganizmus növekedését. Ezen módszereknél a gátlás mértékének megfelelően, a gátlási zónák átmérőit lemérhetők és így a köztük levő különbségek számszerűsíthetők.

A tápfolyadék dilúciós módszer segítségével határozhatók meg pontosabban a minimális gátló koncentrációk (MIC) és minimális baktericid koncentrációk (MBC) értékei. Az előző az a legkisebb hígítási érték, ahol a tesztelendő anyag koncentrációja már képes a baktérium növekedését gátolni, míg az MBC az a hígítás/koncentráció, amely már a baktérium pusztulásához vezet. A fenti meghatározásokat makro- vagy mikrodilúciós módszerekkel is végezhetjük. Az illóolajok biofilm-képzés gátló hatását mikrotiter lemezekon, illetve scanning elektron mikroszkóp segítségével lehet vizsgálni. Ez utóbbival a baktérium morfológiai változásait is nyomon lehet követni (Aiemsaard és mtsai, 2011).

Néhány illóolajról kimutatták, hogy azok képesek a releváns baktériumok spóráinak életképességét befolyásolni vagy a spórákat inaktíválni (sporocid hatás). Ezek közé tartozik az indiai citromfű is. Egy összehasonlító tanulmány szerint az indiai citromfű esetében ez a hatás kifejezettebb volt, összehasonlítva a kakukkfű illóolaj sporocid aktivitásával (Lawrence és Palombo, 2009), és közel azonosnak adódott a fahéj illóolaj hatásával (Lawrence és Palombo, 2009).

Új távlatokat nyithat az alternatív antimikrobás szerek keresésében és fejlesztésében azon

komponensek azonosítása, amelyek felelősek az adott illóolaj antibakteriális hatásáért. Ennek kimutatására a vékony réteg kromatográfián alapuló direkt bioautográfia egy hatékony módszer. Megfelelő festési eljárással, amely az élő baktériumok dehidrogenáz aktivitásának kimutatásán alapszik, vizualizálni lehet, hogy az elválasztott komponensek rendelkeznek-e antimikrobás hatással vagy sem (Horváth és mtsai, 2011). Ennek kiegészítő vizsgálata az egyes illóolajok összetételét meghatározni képes gázkromatográfia. Ez azért nélkülözhetetlen, hiszen pontosan meghatározza, hogy a vizsgált illóolaj milyen összetétellel rendelkezik, hiszen ezt, mint korábban írtam, több tényező is befolyásolhatja, mint a növekedési körülmények (Theis és Lerda, 2003), a betakarítás ideje (Badi és mtsai, 2004) és a szárítási módszerek és kinyerési eljárások (Fathi és Sefidkon, 2012). Az indiai citromfű illóolajának fő komponensei a citrál (65-86%), egy terpenoid, amely két geometriai izomerből áll, a geranial (citrál A, transz izomer) és a neral (citrál B, cisz izomer) (Schaneberg és Khan, 2002; Teuscher és mtsai, 2006). További nagyobb százalékos mértékben előforduló komponensek ezen illóolajban a limonén, citronellál, β -mircén, és geraniol (Schaneberg és Khan, 2002). Az illóolaj fő komponensének antibakteriális hatásáról olvashatunk egyes publikációkban (Long és mtsai, 2019; Zhang és mtsai, 2020).

Az utóbbi években egyre több figyelem fordul az egyes illóolajok antibakteriális hatásmechanizmusainak vizsgálatára felé. Ennek egyik legmodernebb és leghatékonyabb módszere a nagyátersztőképességű transzkriptomi analízis, amely segítségével arra kaphatunk választ, hogy az egyes illóolajokkal történő kezelés milyen módon befolyásolja az RNS szintézist, mely géneket aktivál és melyeket csendesít. A transzkriptom analízis eredménye grafikusán hő térképként prezentálja adott gének expressziójának eltérő szintjeit különböző mintákban (Blumenberg, 2019).

3. FEJEZET: Pitted keratolízis esetből izolált baktériumok jellemzése klasszikus mikrobiológiai módszerekkel

1. A tanulmány céljai:

- a páciens talpán megfigyelhető lézióiból mintavétel és a fertőzést okozó ágensek kitenyésztése, identifikálása,
- az azonosított mikrobák enzimikus aktivitásának meghatározása és ezzel a valószínűsíthető kórokozó ágens meghatározása.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Felhasznált baktériumok, azonosításuk

A munkám során egy 43 éves egészséges férfi talpának pitted keratolízis lézióiból izoláltunk baktériumokat. A fertőzött talp UV lámpa vizsgálatával kizártuk az erythrasma lehetőségét. Lenyomatot és kaparékot vettünk és ezen mintákat Luria Bertani (LB), brain heart infusion (BHI), véres, anaerob véres (hemin és K1 vitamintartalom), és Sabouraud agarra oltottuk, majd egy részét 24 órán keresztül aerob és emelt (5%) CO₂ jelenlétében inkubálva növesztettük, míg az anaerob véres agarokat anaerob körülmények között inkubáltuk 48 órán keresztül. A táptalajokat magunk készítettük és a rajtuk végzett baktérium növesztéseket 37 °C-on termosztátban hajtottuk végre. Az anaerob lemezeket 14 nap elteltével, míg a Sabouraud lemezeket 7 nap inkubációt követően értékeltük.

Ezután következett a baktériumok identifikációja melynek során az azonosnak tűnő morfológiájú telepekből 10-10 kolóniát oltókaccsal felvettünk, majd MALDI-TOF MS segítségével identifikáltunk (De Carolis és mtsai, 2014). Lévén, egy esetben nem hozott eredményt a MALDI TOF alapú identifikálás, ezért 16S rRNS szekvencia alapú meghatározáshoz folyamodtunk. E célból univerzális prokarióta 16S rRNS primereket (Uni16S27_F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, Uni16S1492_R: GGTTACCTTGTTACGACTT) használtunk (Tabei és Ueno, 2010). Az 1465 bp hosszú terméket felamplifikáltuk proofreading Pfu PCR enzim kittel (Thermo Scientific, F-531), majd ligáltuk a pJET1.2/blunt vector (Thermo Scientific, K1231) segítségével. A beillesztett fragment szekvenáló primerekkel történő megszekvenálása után a hiányzó rész a Macr_16S_2 (5' GGCTAACTACGTGCCAGCAG) primer segítségével lett áthidalva. Minden szekvenálás az ABI310 rendszerrel történt az ABI Big Dye Sequencing Protocol alapján, BigDye

Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit-et használva (Thermo Fisher Scientific). A nyert szekvenciák összeillesztéséhez a CLC Sequence Viewer 7.6 verzióját használtuk, majd blasztoltuk az NCBI oldalán (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Az izolált törzseket törzsgyűjteményünkbe lefagyasztottuk.

2.2. Tenyésztési kondíciók

A napi kísérletekhez vizsgált baktériumok közül Müller-Hinton (MH) táptalajra oltottuk ki a *B. thuringiensis*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *Macrococcus* sp. fajokat, míg a *S. parasanguinis* és *S. mitis* fajokat véres agaron inkubáltuk CO₂ termosztátban. Az inkubációk 37 °C-on történtek 24 órán keresztül, majd ezt követően a Streptococcusok kivételével MH tápfolyadékban növesztettük fel a baktériumokat 37 °C-on 24 órán át. A két Streptococcus faj esetében a kísérletes munka napján a friss véres agarról felvett baktériumból PBS-ben készítettünk szuszpenziót, lévén ezen fajokat nem sikerült folyékony tápközegben növesztenünk.

2.3. Enzimatiszus tesztek

Az izolált baktériumok kóroktani jelentőségének megállapításához enzimatiszus aktivitásukat vizsgáltuk. Ehhez kazein-, zselatin-, lipid- és lecitinbontó képességüket figyeltük meg.

Az extracelluláris proteáz termelést módosított tej agaron teszteltük (2 % w/v pepton, 0,6 % w/v NaCl és 2 % w/v agar) (Chu, 2007). Készítéskor az agar koncentrációra kiszámított teljes folyadékmennyiség felét adtuk a táptalaj komponensekhez desztillált víz formájában, majd autoklávozást követően került bele az előzőleg felmelegített (42 °C) 1,5 %-os tej a vízzel megegyező mennyiségben. Az izolátumokat leoltottuk a megszilárdult táptalajra és proteáz-aktivitásukat a beoltást követő 1-2 napos inkubációt követően lehetett leolvasni a pozitív izolátumok körül megjelent feltisztulási zónák megfigyelésével.

Az izolátumok lipáz-aktivitását Tween 80 agaron vizsgáltuk. Az autoklávozott alapoldatot (10 g pepton, 5 g NaCl, 0,1 g CaCl₂ és 15 g agar 1 liter desztillált víz) ~65 °C-ra lehűtöttük, majd hozzáadtunk 5 ml Tween 80 oldatot (Slifkin, 2000). A megszilárdult táptalajra leoltottuk a

vizsgált baktériumokat, majd 1-2 nap inkubációt követően értékeltük azokat a pozitív telepek körül az agarban kialakult pontszerű precipitátumok mértéke alapján.

Lecitináz-aktivitást tojássárgája felhasználásával készült agaron teszteltük. A megmosott, 70 %-os alkohollal fertőtlenített tojásokat feltörtük, majd a tojássárgákat egy steril edényben elválasztottuk és 40 % v/v-ra hígítottuk steril desztillált vízzel. Ebből 10 ml mennyiséget

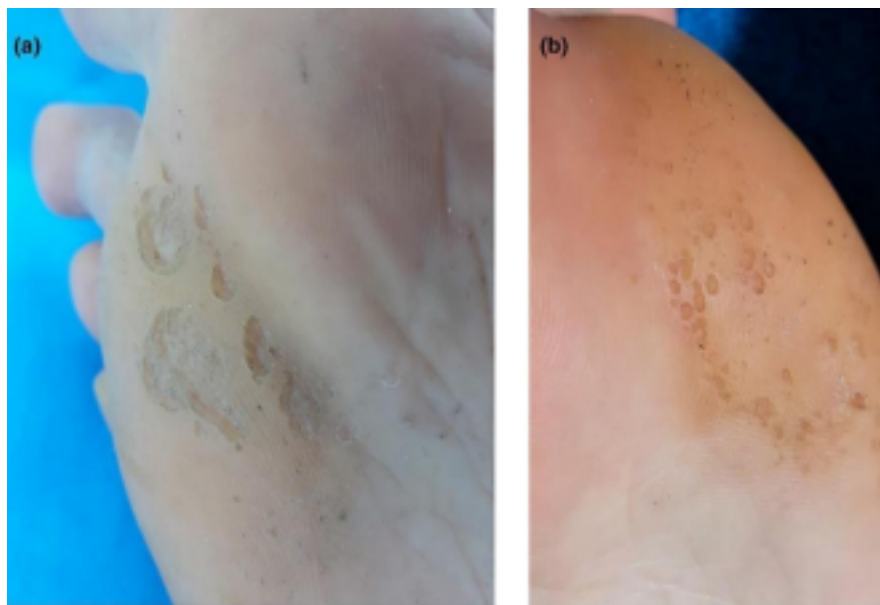
kevertünk az előzőleg elkészített, autoklávozott, ~55 °C-ra hűlt BHI agar 90 ml-éhez. A megszilárdult táptalajokat beoltást követően 3 napig inkubáltuk 28 °C-on. A zsírsavak keletkezését jelző turbid zónák megjelenése jelzi az enzimeszt pozitivitását (Jonit és mtsai, 2016).

Zselatin hidrolízishez széntartalmú zselatin hasábokat használtunk (Lányi, 1980). A steril hasábokat a baktériumok tápoldatos szuszpenziójához adtuk, majd nyugalmi helyzetben 3 napig inkubáltuk 30 °C-on. A zselatinkockák integritását naponta ellenőriztük. A zselatináz termelését a szénpartikulumok cső alá történő leülepedése jelezte (Kohn, 1953).

3. Eredmények

3.1. A pitted keratolízisből izolált baktériumfajok identifikálása, jellemzése

Az egészséges férfi talpán megfigyelt gödröcskék a **6. ábrán** láthatók.



6. ábra: PK tipikus megjelenési formája a talp nyomásnak kitett felületein. Jól megfigyelhetők a mély, folytonos eróziók a jobb talp metatarzális régióján (a), és a kis gödröcskék a bal talp egy másik nyomásnak kitett részein (b).

Az inkubációs időket követően a táptalajokról analízisre átoltott kolóniákat MALDI-TOF MS segítségével meghatároztuk, amelynek során az alábbi fajokat sikerült azonosítani: *B. thuringiensis*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. parasanguinis* és *S. mitis*.

A Sabouraud táptalajon még 7 nappal a leoltást követően sem tapasztaltunk növekedést. A léziókból leoltott fajok tekintetében egy esetben nem sikerült azonosítani a mikróbát. A

klónozott 16S rRNS szekvenciaanalízise viszont 99%-os homológiát mutat különböző *Macrocooccus* fajokkal (GenBank: MZ577562).

Az **3. táblázatban** látható a 6 baktérium izolátum megoszlása a bal illetve jobb talp 6-6 léziójában. *B. thuringiensis* volt az egyetlen faj, ami az összes lézióból kimutatható volt.

3. táblázat: A hat baktérium izolátum megjelenése és eloszlása a bal talp hat, illetve a jobb talp hat léziójában.

Azonosított fajok (átlag MALDI-TOF MS pontszám)	Érintett gödröcskék száma a bal talpon	Érintett krátterszerű bemaródások száma a jobb talpon
<i>Bacillus thuringiensis</i> (2,09)	6	6
<i>Staphylococcus simulans</i> (1,94)	2	3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1,87)	2	2
<i>Streptococcus parasanguinis</i> (2,01)	2	2
<i>Streptococcus mitis</i> (2,14)	2	2
<i>Macrocooccus</i> faj (1,43)	0	2

3.2. Enzimatiszus tesztek

B. thuringiensis mutatta a legerősebb proteolitikus aktivitást (**4. táblázat**). A baktérium ezen tulajdonsága felveti a faj kiemelt szerepét e bőrbetegségben és a többi faj normál bőr mikrobióta vagy opportunistája voltát. A *B. thuringiensis* ezenkívül erős zselatináz aktivitást is mutatott, mely aktivitást megfigyelhetjük a *Macrocooccus* faj és a *S. parasanguinis* esetében is közepes aktivitással. Ez utóbbi két faj csak zselatináz aktivitással rendelkezett. A *S. simulans* baktériumnál a zselatináz kivételével három enzim aktivitása is detektálható volt: gyenge proteáz, illetve közepes lipáz és lecitináz aktivitást figyelhetünk meg. Két baktériumnál (*S. haemolyticus*, *S. mitis*) egyik enzim jelenlétét sem tudtuk kimutatni.

4. táblázat: A léziókból izolált fajok enzimatiskus aktivitása. Az aktivitás mértéke: +++ erős; ++: közepes; +: gyenge; -: nincs).

Fajok	Proteáz aktivitás	Zselatináz aktivitás	Lipáz aktivitás	Lecitináz aktivitás
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+++	+++	-	+
<i>Staphylococcus simulans</i>	+	-	++	++
<i>Macrococcus</i> faj	-	++	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	-	-	-
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	-	++	-	-
<i>Streptococcus mitis</i>	-	-	-	-

30



7. ábra: *B. thuringiensis* erős proteáz aktivitásának detektálása tejagaron. Jól megfigyelhető a baktérium szerpentin jellegű szélesztés menti halo jelenség megléte, mely a kiemésztett tejfehérjére és ezzel a tesztelt faj fehérjebontó enzim szekréciónak utal.

4. FEJEZET: Illóolaj alapú antibakteriális tesztek

1. A vizsgálatok céljai:

- korábbi publikációk adataira támaszkodva, antibakteriális tulajdonsággal rendelkező illóolajok hatékonyságának vizsgálata az esetünkben kórokozó ágensnek tekinthető *Bacillus thuringiensis* baktériumon és két, korábban pitted keratolízis bőrfertőzésért felelősnek tartott baktériumfajon, melyet a Német Nemzeti Törzsgyűjteményből szereztünk be,
- alaposabban megvizsgáljuk a munkánk során az egyik leghatékonyabb antibakteriális tulajdonsággal rendelkező, és emellett a *Bacillus thuringiensis* spóráképzését is gátló illóolaj, az indiai citromfű olaj antimikrobás hatását.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Baktérium izolátumok és tenyésztési körülmények

A *B. thuringiensis* baktériumot a 43 éves férfi talpán található léziókból izoláltuk (Schneider és Schweitzer, 2021) míg a *Kytococcus sedentarius*-t (DSM 20547) és a *Dermatophilus congolensis*-t (DSM 44180) a Német Nemzeti Törzs gyűjteményből (DSMZ) szereztük be (Leibniz Kutatóintézet, Braunschweig, Németország). A munkám során az összes baktériumot aerob körülmények között tenyésztettük. A *B. thuringiensis* baktérium (37 °C) növesztésére tripton szója táptalajt (TSA) (Oxoid, New York, NY, USA), míg a *D. congolensis* (37 °C) és *K. sedentarius* (30 °C) tenyésztésére véres agart használtunk. A minimális gátló-és baktericid koncentrációk meghatározásakor mindhárom fajnál tripton szója tápfolyadékkal (TSB) (Oxoid, New York, NY, USA) dolgoztunk.

2.2. Felhasznált illóolajok

Tizenkét illóolaj (rozsmaring (*Rosmarinus officinalis*), indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*), szegfűszeg (*Eugenia caryophyllata*), muskotályzsálya (*Salvia sclarea*), fahéj (*Cinnamomum zeylanicum*), citronella (*Cymbopogon nardus*), eukaliptusz (*Eucalyptus globulus*), édeskömény (*Foeniculum vulgare*), fodormenta (*Mentha spicata*), borsmenta (*Mentha piperita*), citromfű (*Citrus limon*), és kakukkfű (*Thymus vulgaris*)) antibakteriális hatását teszteltük a 3 baktériumfajjal szemben. Kísérleteinkhez az AROMAX (Aromax Kft, Magyarország) illóolajait használtuk, melyek tisztaságát a vizsgálatokat megelőzően gázkromatográfiával ellenőriztük.

2.3. Antibakteriális teszt-kicseppentéses módszer

A fenti illóolajok antimikrobiális hatását agar lemezekken végeztük kicseppentéses (drop plate) módszert alkalmazva. A kísérlet megkezdése előtt a baktériumok csíraszámait optikai denzitásuk alapján szinkronizáltuk. Ennek során 600 nm-en 0,2-re ($\sim 10^8$ CFU/ml) állítottuk be őket előzetesen PBS-ben szuszpendálva. *B. thuringiensis* szuszpenzióból 100 μ l-t TSA-ra, míg *K. sedentarius* és *D. congolensis* esetében 100-100 μ l-t véres agarra szélesztettünk. Száradás után, mindegyik illóolajból 5 μ l-t cseppentettünk a táptalajok felszínén lévő baktérium gyepekre. A *B. thuringiensis*-t tartalmazó TSA-, illetve a *D. congolensis*-t tartalmazó véres agarokat 37 °C-on, míg a *K. sedentarius*-t tartalmazó táptalajokat 30 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül. Másnap a gátlási zónák átmérőit lemértük és mm-ben kifejeztük.

Ugyanígy jártunk el a citrál és α -terpineol gátlási zónáinak meghatározásánál is. Kontrollként minden esetben erythromycin és clindamycin antibiotikumokat használtunk.

2.4. Minimális gátló koncentráció (MIC) és minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározása

A minimális gátló koncentráció az a legkisebb koncentráció, amely még hatásosan gátolja a baktériumok növekedését. A minimális baktericid koncentráció pedig azon legkisebb koncentráció, amely a kórokozók 99,9 %-át elpusztítja (Moreira és mtsai, 2005). A MIC és MBC értékek meghatározását az úgynevezett makrodilúciós teszt segítségével végeztük. A különböző izolátumokat felnevesztettük, optikai denzitásukat szinkronizáltuk ($OD_{600}=0,2$) (CLSI, 1999). 5-5 ml TSB médium felhasználásával hígítási sort készítettünk: ezen médium térfogatokhoz 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 μ l illóolajat adtunk, így a 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 és 12,8 mg/ml-es koncentrációkat kaptunk. A baktérium szuszpenziókból 5-5 μ l-t mértünk az egyes csövekbe. A kontroll csövek vagy nem tartalmaztak baktériumot (illóolaj-tisztaság vizsgálat) vagy baktériumot és illóolajat sem (médium kontroll).

Az inkubáció 37 °C-on történt, a *K. sedentarius* kivételével (30 °C), majd a gátló koncentrációkat vizuálisan másnap (*B. thuringiensis*), illetve 3 nap múlva (*D. congolensis* és *K. sedentarius*) határoztuk meg. Az MBC-k meghatározásához alapos vortexelést követően 10 μ l mennyiségeket cseppentettünk TSA és véres táptalajra azon csövekből, melyekben nem volt szabad szemmel látható bakteriális növekedés. A cseppeket párhuzamosan elfolyattuk a táptalajok felszínén, majd éjszakán át inkubáltuk őket és másnap értékeltük.

Ugyanezzel a módszerrel határoztuk meg a citrál és α -terpineol MIC és MBC értékeit is 12,8 mg/ml-0,1 mg/ml-es hígítási sort alkalmazva. Kontrollként erythromycin és clindamycin antibiotikumokat használtunk.

2.5. Spóra képzés-gátlás teszt

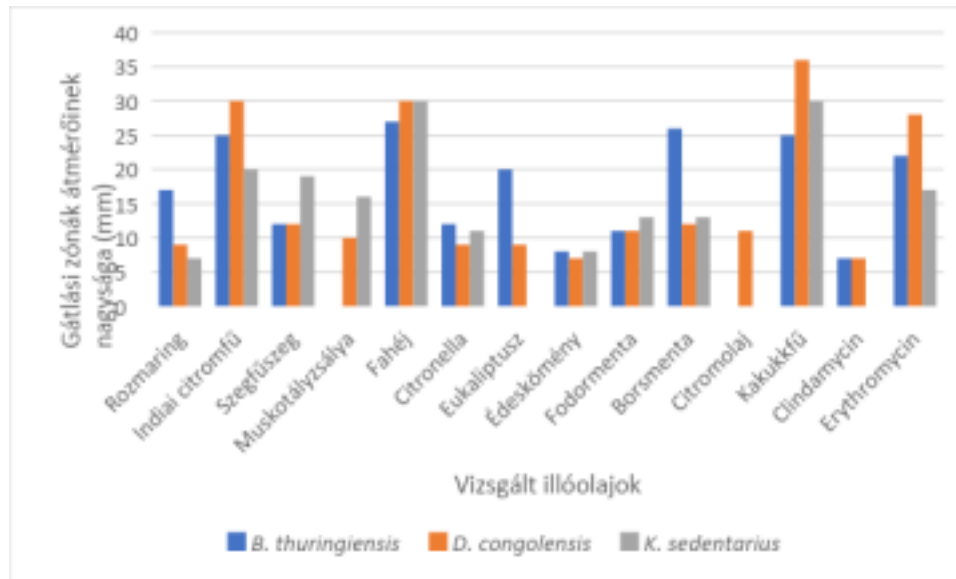
Az illóolajok sporuláció gátlásának vizsgálatához *B. thuringiensis* overnight kultúráját használtuk. Ebből 1000x-es hígítást készítettünk, majd hagytuk nőni 37 °C-on 3 órán keresztül, hogy elősegítsük az esetlegesen jelenlevő spórákból történő vegetatív formává alakulást. Az így nyert kultúrából meghatároztuk a CFU-t, majd 5 μ l szuszpenziót adtunk a teszt csövekhez, melyekbe előzőleg 5 ml TSB tápoldatot mértünk ki, illetve az indiai citromfű illóolaj adott koncentrációit: 0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 16; 32; 64; 128 és 256 μ l (végkoncentrációk: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,5; 25 és 50 mg/ml). 37 °C-on történő 24 órás inkubációt követően, 1-1 ml eket átpipettáztunk 25 ml TSB-t tartalmazó lombikokba azon csövekből, melyekben szabad szemmel nézve nem volt növekedés. 37 °C-on történő 48 órás inkubáció után 10 μ l-es mennyiségeket cseppentettünk ki TSA táptalajokra az élő baktériumok detektálása végett. A kolóniák hiánya azt jelezte, hogy az eredeti 5ml-es térfogatokban sporuláció nem történt és így a baktérium túlélését sikerült meggátolni. Kísérletünket 3-szor ismételtük meg.

3. Eredmények

3.1. Antibakteriális teszt - kicseppentéses módszer

A 12 illóolaj antibakteriális hatékonyságában különbségek figyelhetők meg a kicseppentéses módszert alkalmazva (**8. ábra**). A gátlási zónák (20–36 mm) alapján, a kakukkfű, fahéj és az indiai citromfű bizonyult a leghatásosabb illóolajnak mindhárom vizsgált baktérium esetén.

A többi illóolaj különbözött hatékonyságában a három faj tekintetében. A citromolaj csak *D. congolensis* baktériummal szemben volt hatásos, míg a muskotályzsálya csak *K. sedentarius* és *D. congolensis* fajokkal szemben, az eukaliptusszal szemben pedig csak *B. thuringiensis* és *D. congolensis* mutatott érzékenységet a vizsgált fajok közül. A baktériumok oldaláról vizsgálva, a legérzékenyebb baktérium a *D. congolensis* volt, mivel az összes vizsgált illóolaj mutatott valamilyen antibakteriális hatást e fajjal szemben (**8. ábra**).



8. ábra: A pitted keratolízis fertőzés lehetséges etiológiai ágenseinek érzékenysége a 12 db vizsgált illóolajjal szemben. Az értékek az illóolaj gátlási zónáinak átmérőit jelzik mm-ben megadva. Clindamycin és erythromycin voltak a pozitív kontrollok (alkalmazott koncentrációk: 2 mg/ml).

3.2. Minimális gátló- és baktericid koncentrációk meghatározása

Az illóolajok antibakteriális hatását folyékony tápközegben is teszteltük a minimális gátló és baktericid koncentrációk meghatározása végett (**5. táblázat**). A makrodilúciós tesztekben az összes illóolaj mutatott baktericid hatást különböző koncentrációkban mindhárom baktériumfajjal szemben.

5. táblázat: 12 vizsgált illóolaj minimális gátló-és baktericid koncentrációi a pitted keratolízis betegséggel összefüggésbe hozható baktériumok esetén. MIC és MBC értékek mg/ml-ben vannak megadva. Clindamycin és erythromycin szolgáltak pozitív kontrollként, melyek értékei szintén mg/ml ben vannak megadva.

	<i>B. thuringiensis</i>		<i>D. congolensis</i>		<i>K. sedentarius</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Rozmaring	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,02	0,6 ± 0,07	0,6 ± 0,02	0,2 ± 0	0,5 ± 0,03
Indiai citromfű	0,15 ± 0	0,2 ± 0	0,15 ± 0	0,15 ± 0,02	0,1 ± 0	0,15 ± 0
Szegfűszeg	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,1 ± 0	0,25 ± 0,04
Muskotályzsálya	0,3 ± 0,04	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Fahéj	0,1 ± 0	0,15 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Citronella	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0	0,3 ± 0	0,3 ± 0	0,15 ± 0	0,9 ± 0,07
Eukaliptusz	1,2 ± 0,16	1,2 ± 0,26	2,4 ± 0,13	2,4 ± 0,03	1,8 ± 0,07	2,4 ± 0,03
Édeskömény	4 ± 0,39	4,8 ± 0,26	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0,3 ± 0,04	3,3 ± 0,05
Fodormenta	0,6 ± 0,08	0,6 ± 0,08	0,6 ± 0,08	0,6 ± 0,08	0,4 ± 0	0,8 ± 0
Borsmenta	0,4 ± 0	0,4 ± 0	0,6 ± 0	0,6 ± 0,06	0,25 ± 0,01	0,6 ± 0
Citromolaj	1,2 ± 0,16	1,2 ± 0,16	1,2 ± 0,02	2 ± 0	0,45 ± 0,03	1 ± 0,02
Kakukkfű	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Clindamycin	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,2 ± 0	0,8 ± 0
Erythromycin	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0

3.3. Spóra képzés-gátlás teszt

Nem volt detektálható bakteriális növekedés 24 órás inkubáció után, amikor az indiai citromfű illóolaj koncentrációja 0,2 mg/ml (MIC érték) felett volt *B. thuringiensis* esetében. Miután 1 ml mennyiségeket vittünk át az optikailag tiszta csövekből a 25 ml tápfolyadékot tartalmazó lombikokba, további inkubációt (24 óra, 37 °C), majd konfirmáló kicseppentést követően azt kaptuk, hogy nem volt élő baktérium sejt az indiai citromfű illóolaj 12,8 mg/ml feletti koncentrációinak alkalmazása esetén. Minden más esetben, nem volt tapasztalható gátló hatás, azaz a tápoldatok turbiddá váltak a 24 órás inkubációt követően.

5. FEJEZET: Az indiai citromfű illóolaj összetétele, antibakteriális hatásának vizsgálata elválasztáson alapuló módszerekkel

1. A tanulmány céljai:

- az indiai citromfű komponensösszetételének meghatározása gázkromatográfiával,
- az IC antibakteriális komponenseinek kimutatása bioautográfiával,
- a bioautográfiával kimutatott aktív spotok analízise SPME-GC módszerrel.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Gázkromatográfia-tömegspektrometria (Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS)) analízis

Az analízist Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) rendszer segítségével végeztük, mely Supelco (Sigma-Aldrich, Philadelphia, PA, USA) SLB5MS kapilláris oszloppal van felszerelve (30 m × 250 µm × 0,25 µm). A GC fűtő hőmérséklete úgy állítottuk be, hogy növekedjen 60 °C-ról (3 perc izotermikus) 250 °C-ra (8 °C/perc) (1 perc izotermikus). Magas tisztaságú héliumot (6,0) használtunk vivő gázként 1,0 ml/percen (37 cm/s) állandó áramlási üzemmódban. A tömeg szelektív detektorral felszerelt négypólusú tömeg analizáló elektron ionizációs, teljes pásztázó üzemmódban működött 70 eV-n (41–500 amu at 3,2 scan/s). Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software segítségével (Agilent, Santa Clara, CA, USA) értékeltük ki. A komponensek azonosítását a retenciós adatok, illetve a rögzített spektrumok irodalmi adatokkal való összehasonlításával végeztük, majd a NIST 2.0 könyvtár alapján határoztuk meg. A százalékos becslést terület normalizálással végeztük.

2.2. Vékonyréteg kromatográfia-direkt bioautográfia (Thin Layer Chromatography Direct Bioautography (TLC-DB))

Az indiai citromfű illóolajának teljes összetételét és specifikus antibakteriális komponenseit 2 előre előkészített (100 °C, 30 perc) 5 × 10 cm 60 F₂₅₄ TLC lemezen (Merck, Darmstadt, Németország) vizualizáltuk a korábban leírtak szerint (Kovács és mtsai, 2018), kevés módosítással. 0,2 µl-es mennyiségeket cseppentettünk a lemezek alján lévő vízszintes vékony

vonatra; oldószer kontrollként etanolt használtunk. Citrált (20 mg/ml; Sigma Technology Hungary, Budapest, Magyarország) és α -terpineolt (100 mg/ml; Sigma Technology Hungary) használtunk ismert futási paramétereik miatt. A TLC lemezek kifejlesztése toluén-etil acetát 97:3 arányú elegyét tartalmazó kettős falú kamrában (CAMAG, Muttenz, Svájc).

D. congolensis esetében 1 órán keresztül, míg a másik két baktériumnál 10 másodpercig inkubáltuk a lemezeket 50 ml baktérium szuszpenzióban (TSB) (3×10^8 CFU/ml). Ezután a lemezeket pára kamrában inkubáltuk (*B. thuringiensis*-nél 37 °C-on 2 óráig, *D. congolensis*-nél 37 °C-on 6 óráig, *K. sedentarius*-nál 30 °C-on 6 óráig). Másnap a lemezeket bemerítettük MTT vizes oldatába (0,05 g/90 ml) 10 másodpercen keresztül, majd a megfelelő körülmények között pára kamrákban inkubáltuk őket a fehér foltok megjelenéséig. Az elválasztott komponensek antibakteriális aktivitását a fehér foltok kékes háttérrel szembeni megjelenése jelzi (Kovács és mtsai, 2018).

Az indiai citromfű illóolaj elválasztott komponenseinek láthatóvá tételéhez a másik (MTT-vel nem kezelt) lemezeket bemerítettük etanosos vanillin-szulfursav reagensbe, majd 90 °C-on 5 percig fűtöttük. Az elválasztott komponenseket az R_f értékek szerint jellemeztük, két ismert standard (citrál, α -terpineol) és a Kovats index alapján. R_f érték definíciója: az adott komponens által megtett távolság osztva az oldószer front által megtett távolsággal. Adott rendszerre ismert hőmérsékleten ez a komponens jellemzője és segít a komponensek azonosításában (Daintith, 2008). A Kovats retenció index olyan fogalom, mely a retenció időt (adott komponens GC oszlopon eltöltött ideje) (Anjum és mtsai, 2023) átalakítja egy sokkal megbízhatóbb és megismételhető rendszerre (Idroes és mtsai, 2019).

2.3. Gőztér szilárd fázisú mikroextrakció körülményei ((Headspace-Solid-Phase Microextraction (SPME))

Az indiai citromfű illóolaját és a vékonyréteg kromatográfia (Thin Layer Chromatography=TLC) alapú bioautográfia lemezből kivágott fehér foltot a HS-SPME analízis segítségével vizsgáltuk. Az indiai citromfű illóolaj esetében a folyékony illóolajat vizsgáltuk, míg a fehér foltnál a kivágott szilika lemez volt az analizált minta. A minták 20 ml-es fiolákba kerültek, majd lezártuk őket szilikon-PTFE szeptummal az analízis megkezdése előtt. A statikus, vagy más néven egyensúlyi gőztéranalízis SPME technikát a CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Svájc) automata multifunkciós mintavevő használatával kivitelezettük, melyhez 65 μ M-os StableFlex karboxén/polidimetilsziloxán/divinilbenzén SPME szál (Supelco, Bellefonte, PA, USA). 100 °C-on történő 5 perces inkubációt követően, ezzel a

fűtött tűvel mintát vettünk a mintát tartalmazó fiola gőzteréből (100 °C, 10 perc). A tű ezután rögtön átkerült a GC/MS készülék injektor nyílásába, majd deszorbeáltattuk 250 °C-on 1 percig. Az injektálás folyamatosan történt. Az SPME szál tisztítása és kondicionálása a szálcsatornában tiszta nitrogén atmoszférában 250 °C-on 15 percig történt.

2.4. Citrál és α -terpineol antibakteriális hatásának kimutatása - kicseppentéses módszer

A kísérlet elvégzése citrál és α -terpineol esetén is a 4. fejezet 2.3.-as pontjában már ismertetett módszer szerint történt.

2.5. Citrál és α -terpineol minimális gátló-és baktericid koncentrációinak kimutatása

A kísérletet a 4. fejezet 2.4.-es pontjában leírt módszer alapján végeztük.

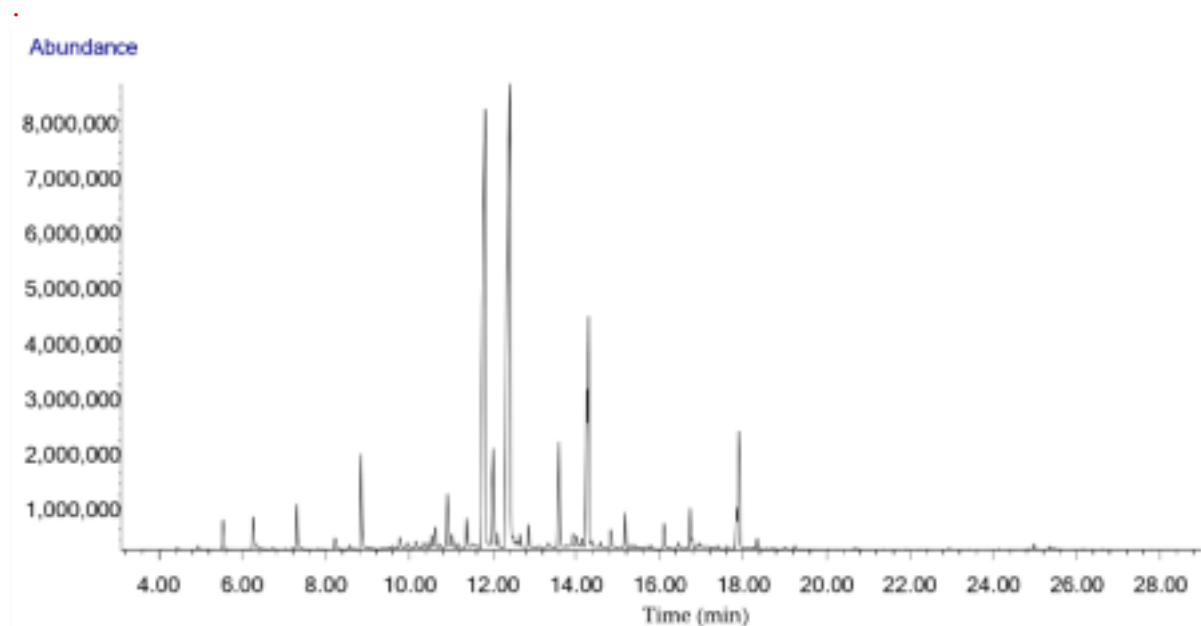
2.6. Antibakteriális komponensek kimutatása bioautográfiával

Az 5. fejezet 2.2.-es pontjában leírt módszert alkalmaztuk az antibakteriális komponensek kimutatására is a három vizsgált baktériumfaj esetén.

3. Eredmények

3.1. GC-MS analízis eredmények

Aromax indiai citromfű illóolaja 60,6% citrált, 34,5% geraniált és 26,1% nerált tartalmaz. A kis illékony komponensek közé kariofillén-oxid (4,7%), geraniol (4,3%), linalool (2,6%), α terpineol (1,7%), γ -kadinén (1,4%) és limonén (1,3%) tartozik (9. ábra, 6. táblázat).



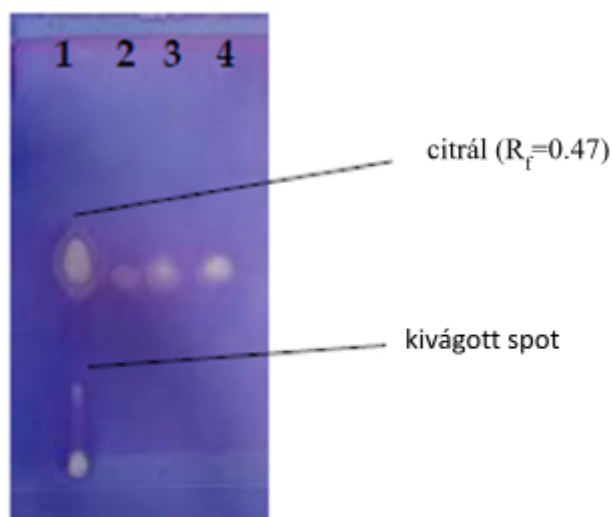
9. ábra: Az általunk használt nyugat indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*) komponensösszetételének kromatogramma GC-MS analízissel. Minden komponenst azonosítottunk a 6. táblázat adatai alapján (tR (perc)).

6. táblázat: Az általunk használt Nyugat indiai citromfű illóolaj (*Cymbopogon citratus*) komponenseinek neve, retenciós ideje, Kováts indexe, százalékos előfordulása A kivágott foltból meghatározott komponenseket félkövérrel jelöltük.

Komponensek neve	TR (perc)	KI	% -os előfordulás	
			Indiai citromfű illóolaj	Frakció
Kamfén	5.5	941	0.8	
Limonén	7.3	1023	1.3	
Linalool	8.8	1091	2.6	
Verbenol	10.5	1171	0.4	
α-Terpineol	10.9	1190	1.7	13.2
Karveol, transz	11.0	1195	0.5	
Karveol, cisz	11.4	1216	1.0	
Nerál	11.8	1237	26.1	
Geraniol	12.0	1247	4.3	
Piperiton	12.1	1253	0.6	
Geraniál	12.4	1268	34.5	
Geraniil formát	12.8	1289	0.7	
Neril acetát	13.9	1350	0.7	
β-Kariofillén	15.2	1424	1.0	
Kadinén	16.7	1513	1.4	7.0
Kalamenén	16.9	1525	0.6	3.7
Kariofillén-oxid	17.9	1588	4.7	
Szum			82.2	
M*140	6.3	977	0.8	
M*155	8.2	1064	0.4	
M*152	9.7	1133	0.5	
M+166	10.6	1176	0.6	
M*166	12.6	1279	0.4	
M*168	13.6	1333	3.2	
M*164	14.1	1361	0.4	
M*204	14.3	1372	9.8	
M*166	14.8	1400	0.6	
M*204	16.1	1475	0.7	
Sum			17.4	

3.2. Indiai citromfű illóolaj antibakteriális komponenseinek analízise vékonyréteg kromatográfiához kapcsolt direkt bioautográfiával (TLC-DB)

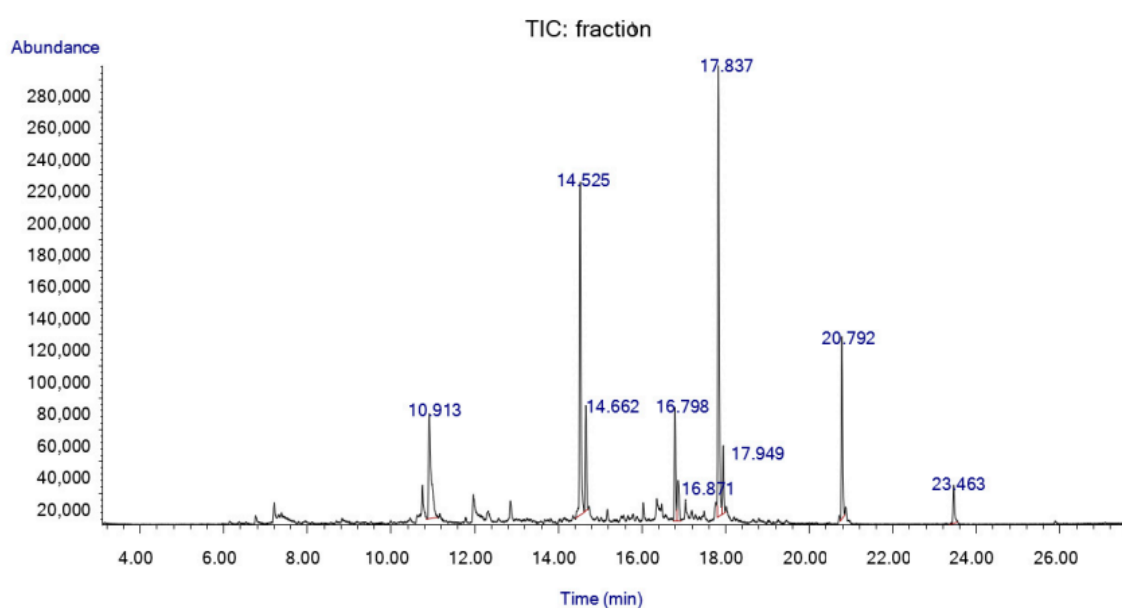
A TLC-DB módszert használtuk annak érdekében, hogy kiderítsük az indiai citromfű illóolajának azon detektálható komponenseit, melyek antibakteriális hatással rendelkeznek. Az R_f érték alapján, az indiai citromfű illóolaj fő komponense a citrál. Ezt a kereskedelmileg beszerezhető citrál kontrollal is megerősítettük. Az R_f érték alapján egy karakterisztikus foltot nem tudtunk azonosítani. Ezt a foltot kivágtuk a szilika lemeztől (10. ábra) és tovább vizsgáltuk preparatív kromatográfiás módszerrel.



10. ábra: Indiai citromfű illóolaj antibakteriális aktivitású komponensei *B. thuringiensis* esetén. A lemezre felvitt illókony teszt-anyagok felvitelének sorrendje és mennyisége a következő volt: 1-indiai citromfű illóolaj (0,2 mg); 2-citrál (0,02 mg); 3-citrál (0,04 mg); 4-citrál (0,08 mg).

3.3. Ismeretlen antibakteriális komponensek azonosítása HS-SPME/GC-MS analízissel

A szilika lemezről kivágott folt HS-SPME/GC-MS analízisének eredményeként, meg tudunk különböztetni 9 karakterisztikus csúcsot és számos kisebbet is (**11. ábra**). α -terpineol, γ -kadinén és kalamenén mennyisége 13,2%; 7,0% és 3,7%.



11. ábra: A szilika lemezről kivágott spot HS-SPME/GC-MS kromatogramja.

7. táblázat: A kivágott foltból meghatározott komponensek és százalékos arányuk.

Komponensek neve	Komponens százalékos aránya	Retenciós indexek
α -terpineol	13,2	1190
γ -kadinén	7,0	1513
kalamenén	3,7	1525

3.4. Citrál és α -terpineol antibakteriális hatásának kimutatása - kicseppentéses módszer

Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a citrál és α -terpineol antibakteriális aktivitásában, mikor a kicseppentéses módszert alkalmaztuk. A citrál esetében nagyobb gátlási zónát mértünk mindhárom baktériumfajnál, összehasonlítva az α -terpineollal (**8. táblázat**). A különbség legkifejezettebben a *D. congolensis* és *B. thuringiensis* esetében mutatkozott és minimális volt

K. sedentarius baktériumnál.

8. táblázat: Citrál és α -terpineol (5 μ l) antibakteriális hatása a három vizsgált baktériumfajon. Az értékek mm-ben megadott átmérőben fejeztük ki.

	Citrál (átmérő mm-ben)	α -terpineol
<i>B. thuringiensis</i>	29 \pm 2	17 \pm 3
<i>D. congolensis</i>	23 \pm 2	7 \pm 1
<i>K. sedentarius</i>	14 \pm 2	6 \pm 1

3.5. Citrál és α -terpineol minimális gátló-és baktericid koncentrációinak kimutatása

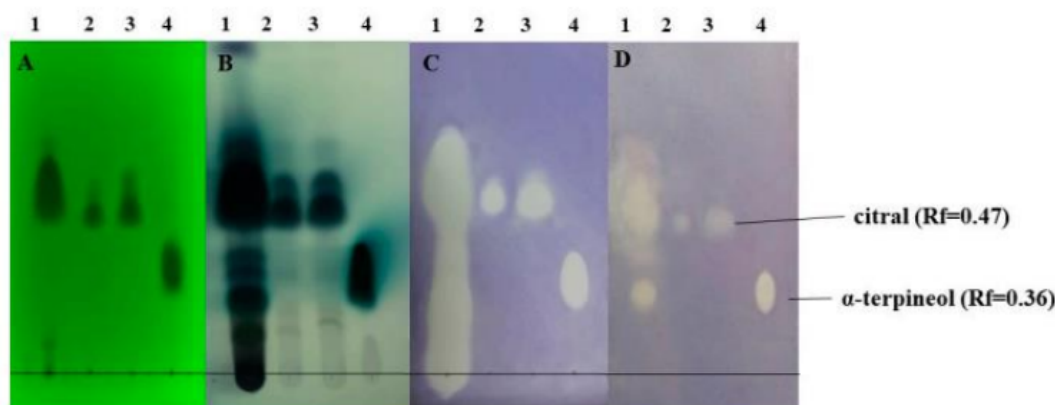
Makrodilúciós antibakteriális teszttel megállapítottuk, hogy az α -terpineol gyengébb antibakteriális hatással rendelkezik az alkalmazott koncentráció tartományban (0,1-12,8 mg/ml) (**9. táblázat**). Ezzel szemben a citrál erősen gátolta a három baktériumfajt. A **9. táblázat** adataiból látszik, hogy alacsony MIC és MBC értékeket kaptunk.

9. táblázat: Citrál és α -terpineol MIC és MBC értékei. Koncentrációk mg/ml-ben vannak kifejezve.

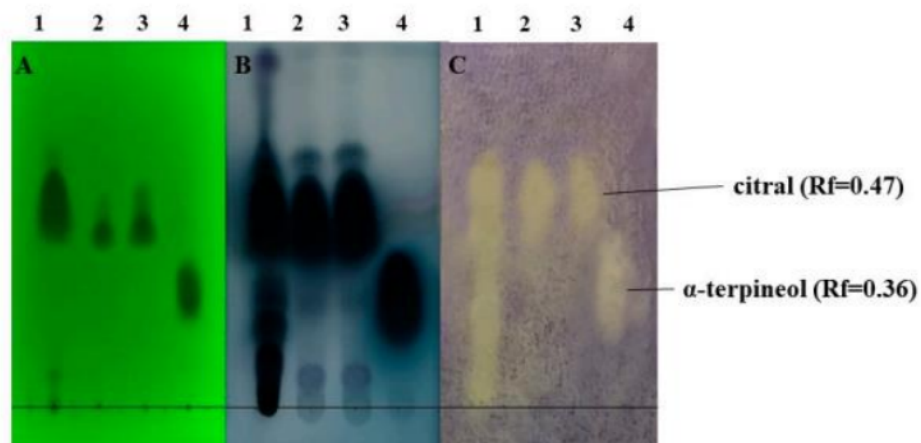
	Citrál		α -terpineol	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. thuringiensis</i>	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,8 \pm 0	0,8 \pm 0
<i>D. congolensis</i>	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,4 \pm 0	0,8 \pm 0
<i>K. sedentarius</i>	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,4 \pm 0	0,8 \pm 0

3.6. Citrál és α -terpineol antibakteriális sajátosságának konfirmálása vékonyréteg kromatográfiához kapcsolt direkt bioautográfiával (TLC-DB)

A kromatográfiás elválasztások minősége megerősítést nyert mielőtt kifejlesztettük volna, UV lámpa megvilágítása alatt (**12A és 13A ábrák**). Itt látható néhány fő komponens. Vanilin szulfursavas kifejlesztés feltárta az indiai citromfű illóolaj minta további komponenseinek jelenlétét (**12B (1) és 13B (1) ábrák**). A vékonyréteg kromatográfia alapú direkt bioautográfiás módszer megmutatja az egyéb antibakteriálisan aktív komponens/komponens csoportot, mely hatásos volt mindhárom tesztelt baktériumfajjal szemben (**12C,D és 13C ábrák**); a *K. sedentarius* fajnál határozottan elkülönült (**12D (1) ábra**) két komponens látható. A *B. thuringiensis* és *D. congolensis* esetében (**12C (1) és 13C (1)**) az indiai citromfű illóolaj jelenlévő komponensei összefolynak a *K. sedentarius*-szal ellentétben. Az indiai citromfű illóolajat *B. thuringiensis* és *K. sedentarius* baktériumoknál hígítottuk. Citrál ($R_f=0.47$) és α terpineol ($R_f=0.36$) aktivitása megfigyelhető mindegyik baktériummal szemben (**12C,D és 13C ábrák**).



12. ábra: Indiai citromfű illóolaj antibakteriális komponensei TLC-DB után. (A) Lemez UV 254 nm megvilágítás alatt, (B) TLC lemez vanilin-szulfursav kezelést követően látható fényben nézve, (C) TLC-DB kísérlet: *B. thuringiensis* bioautogramja, (D) TLC-DB kísérlet: *K. sedentarius* bioautogramja (a világos zónák jelentik az antibakteriális hatást). Mobil fázis: diklórmetán és toluén-etil acetát 93:7 v/v. A komponensek alkalmazott térfogatai a következők voltak: indiai citromfű illóolaj-6 μ l, citrál 4.5 és 6 μ l, α -terpineol-1.5 μ l. A törzsoldatok koncentrációi a következők voltak: indiai citromfű illóolaj-200 mg/ml, citrál-20 mg/ml, α -terpineol-100 mg/ml. Az illékony teszt-anyagok felviteli sorrendje és mennyisége a következő volt: 1-indiai citromfű illóolaj (1.2 mg); 2-citrál (0.09 mg); 3-citrál (0.12 mg); 4- α -terpineol (0.15 mg).



13. ábra: Indiai citromfű illóolaj antibakteriális komponensei TLC-DB után. (A) lemez UV 254 nm alatt, (B) lemez vanilin-szulfursav kezelést követően látható fényben nézve, (C) TLC-DB kísérlet: *D. congolensis* bioautogramja (világos zónák jelentik az antibakteriális hatást). Mobil fázis: diklórmetán és toluén-etil acetát 93:7 v/v. Az alkalmazott térfogatok a következők voltak: indiai citromfű illóolaj: 1 μ l, citrál: 4.5 és 6 μ l, α -terpineol: 4.5 μ l. Az indiai citromfű illóolajat hígítás nélkül vittük fel, illetve a citrál és α -terpineol esetében a törzsoldatok koncentrációja 100 mg/ml volt. Az illékony teszt-anyagok felviteli sorrendje és mennyisége a következő volt: 1-indiai citromfű illóolaj (hígítatlan); 2-citrál (0.45 mg); 3-citrál (0.6 mg); 4- α -terpineol (0.45 mg).

6. FEJEZET: Indiai citromfű illóolajat tartalmazó különböző kenőcsalapok *in vitro* tesztelése, kioldódási vizsgálatok

1. A tanulmány céljai:

- Az indiai citromfű illóolaj különböző koncentrációit tartalmazó kenőcsalapok *in vitro* tesztelése annak kiderítésére, hogy az eltérő összetételű kenőcsalapok milyen mértékben támogatják vagy akadályozzák az IC illóolaj antibakteriális tulajdonságának megnyilvánulását *B. thuringiensis* tenyészetén.
- mesterséges bőrpenetrációs membránrendszeren történő kioldódási vizsgálatok, annak kiderítésére, hogy az egyes kenőcsök mennyire szelektíven tartják vissza az IC egyes komponenseit.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Felhasznált kenőcsalapok

- Cremor aquosus
- Hydrogel „95%”
- Lipogel
- Vaselinum

Ezen gyógyszerári alapkrémekbe 1, 3 és 5%-ban belekevertük az indiai citromfű illóolajat, majd *in vitro* teszteléshez használtuk őket.

2.2. Antibakteriális tesztek menete

B. thuringiensis kezdeti logaritmikus tenyészetét használtuk kísérletünkhöz: a baktériumszuszpenzióból 50-50 µl-t cseppentettünk LB agar felszínére, majd megvártuk, míg megszáradnak a cseppek. Ezután steril oltókacs segítségével felvittük a baktérium felcseppentések felszínére az illóolaj tartalmú kenőcsöket, illetve kenőcs kontrollokat (illóolaj mentesek). Egy órás inkubáció után 3 x 3 mm-es kockákat vágunk ki a kenőcsöt tartalmazó agarból steril szike segítségével, majd a mintákat 300 µl PBS-be tettük. Alapos vortexelést követően a teljes 300 µl mennyiségeket kiöntöttük táptalaj felszínére, majd steril üvegglassal elszélesztettük őket. Végül a Petri-csészéket betettük inkubálni 37 °C-ra és másnap leolvastuk

az eredményeket. Növekedés esetén megszámoztuk a telepeket és kiértékeljük a kapott eredményeket. Ezen *in vitro* kísérletet további 10 *Bacillus* izolátummal is elvégeztük.

2.3 Kioldódási kísérletek menete

Az eltérő kenőcsanyagokba emulgeált indiai citromfű bőrben történő penetrációjának vizsgálatához egy átfolyós rendszerű modell rendszert használtunk. Ennek során a bőrt egy szintetikus membrán volt hivatva reprezentálni, melyen keresztül a kenőcsből egy keringető rendszer segítségével kimostuk a kenőcs által tartalmazott és kioldható komponenseket és ezen folyadékból 30, 60, 90, 120 és 300 perc elteltével mintát vettünk. A mintákat összegyűjtöttük és a bennük fellelhető komponenseket GC-MS analízissel minőségi és mennyiségi analízisnek vetettük alá.

A kioldódási kísérletekhez a PAMPA permeabilitás mérések kivitelezése, hagyományos STIRWELL™ PAMPA szendvicseket (Pion Inc.) használtunk. Az adott szövetspecifikus membránt közvetlenül a mérések előtt alakítottuk ki a felső, akceptor lemez filterein. Eme bőr PAMPA (Skin PAMPA) esetén kereskedelmi forgalomban kapható lemezeket használtunk, amin már ki volt alakítva a bőr stratum corneumára jellemző lipidmátrix. A mérések előtt a Skin PAMPA membránját hidratáltuk egy éjszakán keresztül az erre a célra használatos hidratáló oldattal (Hydration Solution, Pion Inc.), és csak megfelelő hidratált állapot esetén használtuk a szendvicset. A hidratáltságról a cellák filtereinek vizuális vizsgálatával lehet meggyőződni. Mérésre alkalmas a membrán, ha fény felé fordítva annak felülete világos, ezzel szemben a nem kellőképpen hidratált membrán sötét árnyalatú. A permeabilitást a PAMPA kísérleteket tekintve hagyományos elrendezésben vizsgáltuk, azaz a felső lemez volt az akceptor fázis, míg a donor fázist az alsó lemez alkotta. Az eltérő összetételű kenőcsöket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk olyan koncentrációt alkalmazva, melyet az oldhatóságuk és az UV spektrofotometriás tulajdonságuk lehetővé tett (5-20 mM). 180 µl eltérő pH-jú, 1 v/v% DMSO törzsoldatot tartalmazó Britton-Robinson puffer oldatot mértünk a PAMPA szendvicsek alsó lemezének celláiba. Emellett a cellák egy-egy mágneses keverőt is tartalmaztak. A felső, akceptor lemez celláiba 200 µl pH 7,4 Britton-Robinson puffert pipettáztunk. Az oldatok párolgását megakadályozandó, nedves szűrőpapírral és egy, a PAMPA lemezekre illeszkedő műanyag fedéllel fedtük le az összeállított rendszert. A kialakított szendvicset mágneses keverőre (Gut-Box™, Pion Inc.) helyeztük, és a kevertetés intenzitását úgy állítottuk be, hogy a NKVR hozzávetőlegesen 40 µm vastagságú legyen. A mérések teljes időtartama 5 óra volt.

2.4. SPME-GC-MS analízis

Az illóolaj és a kenőcs minták vizsgálata SPME-GC-MS módszerrel történt.

SPME-GC-MS: szilárd fázisú mikroextrakciós mintavétel után gázkromatográfiás és tömegspektrometriás módszer.

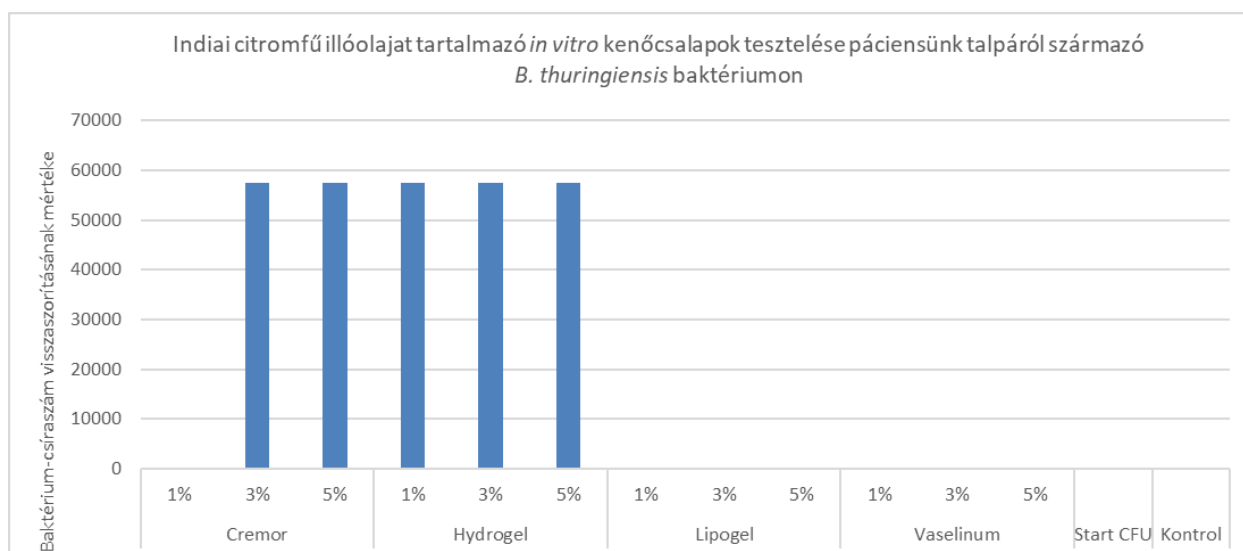
10 µl illóolajat vagy 1 ml mintát vizsgáltunk 20 ml-es, szilikon/PTFE szeptummal lezárt headspace (HS) üvegben. A minta statikus gőztéranalízise szilárdfázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME) történt, CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) típusú automata mintavevő alkalmazásával. A minta 5 perces 100°C-on végzett inkubálása után a 65 µm filmvastagságú StableFlex divinilbenzol/carboxen/polidimetilsziloxán (DVB/CAR/PDMS) SPME szálát (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a minta gőzterébe juttattuk, az extrakciót 20 percig végeztük 100°C-on, majd a gázkromatográf injektorába vittük, ahol a deszorpció 250°C-on történt, 1 percig. Az illóolaj esetében az injektálás split módban történt (1:90 split aránnyal), a kenőcsök és a többi folyékony minta esetében splitless módban. Végül a szálát nagy tisztaságú nitrogén gázban 250°C-on 15 percig tisztítottuk és kondicionáltuk.

Az analízist Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) készülékkel, Supelco SLB-5MS kapilláris kolonnán (30 m × 250 µm × 0,25 µm) végeztük. A kolonna hőmérséklete egy 3 perces izoterm szakasz után 60-250 °C-ra emelkedett 8 °C/perc sebességgel, a végső hőmérsékletet 1 percig tartottuk. A vivőgáz nagy tisztaságú, 6,0 hélium, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc (37 cm/s) volt, constant flow módban. A detektálás quadrupole tömegszelektív detektorral elektronionizációs módban (70 eV), teljes scan módban (41–500 amu, 3,2 scan/s) történt. Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) segítségével értékeltük ki. A kvantitatív azonosítás során a komponensek retenciós idejét és tömegspektrumait standardok és a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést területnormalizációval végeztük.

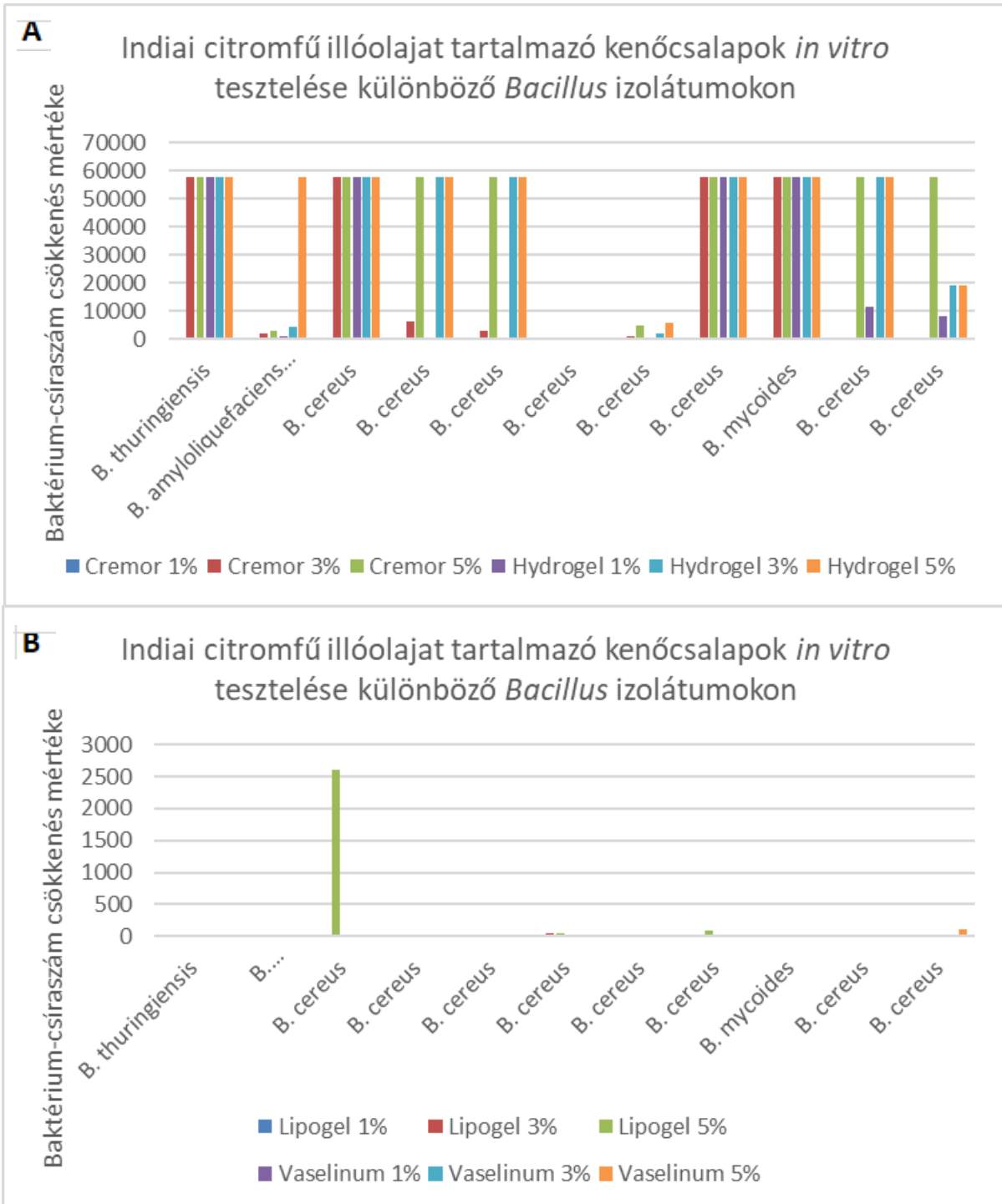
3. Eredmények

3.1 Antibakteriális tesztek

Az illóolajat 1%, 3% és 5%-os koncentrációban tartalmazó Hydrogel kenőcsalap teljes feltisztulást eredményezett páciensünk lábáról kitenyésztett *B. thuringiensis* baktérium esetében. A Cremor kenőcsalap 3% és 5%-os illóolaj tartalom mellett szintén teljesen gátolta a baktérium növekedését, ugyanakkor 1%-os koncentrációban alkalmazva csekély mértékű gátlást eredményezett csak. A lipogél és vazelin kenőcsalapoknál a legmagasabb, 5%-os illóolaj koncentráció esetén sem tapasztalható gátlás. Ez volt tapasztalható páciensünk lábáról kitenyésztett *B. thuringiensis* baktériumfajon (**14. ábra**). Ezt követően a további *Bacillus* fajokkal elvégzett kísérletekből is az látszik, hogy a Hydrogel kenőcsalapban tudta leginkább kifejteni hatását az illóolaj, illetve a hidrofób kenőcsalapok esetén nem volt/kevésbé volt hatékony az illóolaj. A részletes táblázat, melyben a baktériumtelepek száma és a csíraszám csökkenés mértéke látható, a **3. sz. melléklet** tartalmazza.



14. ábra: Indiai citromfű illóolajat tartalmazó négyféle kenőcsalap *in vitro* tesztelése.



15. ábra: Indiai citromfű illóolajat tartalmazó hidrofil kenőcsalapok (A) és hidrofób kenőcsalapok (B) *in vitro* tesztelése

3.2 Kioldódási kísérletek

3.2.1. Az indiai citromfű illóolaj fő komponenseinek meghatározása SPME-GC-MS analízissel

Aromax Indiai citromfű illóolaj (*Cymbopogon citratus*) fő komponensei a **10. táblázatban** láthatóak félkövér betűstílusban. Megfigyelhető, hogy kísérleteinkben alkalmazott illóolaj fő komponensei a citronellál (28,16%), a nerál (10,55%), a geraniál (12,95%) és a β -kariofillén (32,86%).

10. táblázat: Aromax indiai citromfű komponens összetétele és fő komponensei.

		Indiai citromfű
RRT	A komponens neve	<i>ILLÓOLAJ</i> <i>100%</i>
5,1	α -Pinén	0,36
5,47	Kamfén	0,86
6,08	β -Pinén	0,35
6,2	6-Metill-5-heptén-2-on	0,44
7,24	Limonén	0,20
7,31	Eukaliptol	0,39
8,16	4-Nonaon	0,59
8,79	Linalool	0,68
9,976	Citronellál	28,16
10,135	Isopulegol, iso	2,16
11,459	Citronellol	1,82
11,7	Nerál	10,55
11,925	Geraniol	1,99
12,31	Geraniál	12,95
13,71	Citronellil acetát	0,35
14,233	Geranil acetát	1,46
15,17	β-Kariofillén	32,86
15,73	α -Humulén	0,28
16,669	γ -Kadinén	0,33
17,84	Kariofillén oxid	2,92
	SZUMMA	99,67

3.2.2. Kenőcs alapok (kontroll) összetételének vizsgálata

A kontrollként használt kenőcs alapokban illóolaj eredetű komponens nem volt mérhető, kivéve a Cremor aquosus-ban, ahol a limonén tartalom 0.97% volt. A teljes mérési eredményt az **1. sz. melléklet** tartalmazza.

3.2.3. Kenőcsalap + 1% illóolaj komponens összetétele

Azokban a kenőcs alapokban, ahol az indiai citromfű illóolajat 1%-ban tartalmazta a kenőcs, az alábbi fő komponensek voltak mérhetőek (**11. táblázat**) (részletesen lásd **2. sz. melléklet**). A 2. mintában (Hydrogel) volt csak jelen a p-Cymen-8-ol nevű komponens. A nerál komponens a lipogel és vaselinum mintákban nagyobb mennyiségben található meg, a vaselinum mintában 18,6 m/m% a mért mennyisége. A nerál a hydrogel minta kivételével mindegyik mintában előfordult. A geraniálról is elmondható, hogy a 3. és 4. mintában jelentős mennyiségen fordul elő (lipogel 19,9 és vaselinum 40,1 m/m%) és hiányzik a hydrogel mintából. A vaselinum mintában a geraniol, a hydrogel mintában a geranil acetát és a γ kadinén volt jelen a legnagyobb arányban. A γ -kadinén nem volt detektálható a lipogel és vaselinum mintákban.

11. táblázat: Az 1% indiai citromfű illóolajat tartalmazó kenőcs alapok összetételeinek vizsgálata a bőrpenetrációs kísérlet előtt SPME-GC-MS.

Illóolaj komponens	1. Cremor + 1%	2. Hydrogel 95% + 1%	3. Lipogel + 1%	4. Vaselinum + 1%
	Mennyiség (m/m%)			
p-Cymen-8-ol	-	7,5	-	-
Nerál	3,8	-	9,3	18,6
Geraniol	0,6	2	2,4	10,1
Geraniál	6,9	-	19,9	40,1
Geranil acetát	2	10,4	2,3	5,6
γ -kadinén	0,5	13,4	-	-

3.2.4. A bőrpenetrációs modell eredményei

A **13. táblázat** adatai alapján látszik, hogy a legtöbb illóolaj eredetű komponens a Hydrogel 95% + 1% mintáiból volt mérhető.

A p-cymen-8-ol megjelenése a limonén vagy a citrál (geraniál + nerál) bomlása miatt lehetséges. A limonén bomlásából limonén-oxidok keletkezhetnek, illetve α -terpineol. A linalool bomlásából α -terpineol, geraniol és nerol keletkezhet. Geraniol bomlásából keletkezhet linalool, α -terpineol, nerol (He és mtsai, 2018)

Mindegyik mintában megjelent egy komponens 16,5 percnél, de ennek az azonosítása nem sikerült.

12. táblázat: 1% illóolajat tartalmazó Cremor kenőcs alapból adott időpontokban kioldódott és mérhető mennyiségű komponensei.

Cremor + 1%	
Mintavétel ideje	Mért komponensek a mintában
30 perc	Nem azonosítható komponensek a mintában.
60 perc	Nem azonosítható komponensek a mintában.
90 perc	Nem azonosítható komponensek a mintában.
120 perc	Nem azonosítható komponensek a mintában.
300 perc	Megjelent a linalool (7%), egy linalil-származék (3-7%), kámfor (1%), és a β -kariofillén (4-9%). További nem azonosítható komponensek a mintában.

13. táblázat: 1% illóolajat tartalmazó Hydrogel 95% kenőcs alapból adott időpontokban kioldódott és mérhető mennyiségű komponensei.

Hydrogel 95% + 1%	
Mintavétel ideje	Mért komponensek a mintában
30 perc	Linalool oxid (2-5%), p-cymen-8-ol (12-18%), α -terpineol (8-16%), illetve nem azonosítható komponensek a mintában.
60 perc	Linalool oxid (4-8%), linalool (3%), borneol (5-7%), p-cymen-8-ol (22-25%), α -terpineol (20-22%), piperiton (1-2%), illetve nem azonosítható komponensek a mintában.
90 perc	Linalool oxid (4-9%), linalool (3%), kámfor (1%), borneol (7%), p-cymen-8-ol (25-27%), α -terpineol (23-26%), piperiton (1-3%), illetve nem azonosítható komponensek a mintában.
120 perc	Linalool oxid (1-4%), borneol (5-7%), p-cymen-8-ol (13-23%), α terpineol (13-24%), illetve nem azonosítható komponensek a mintában.
300 perc	Linalool oxid (3-6%), linalool (5-6%), borneol (7%), p-cymen-8-ol (18-24%), α -terpineol (19-27%), piperiton (1,8%) illetve nem azonosítható komponens a mintában.

14. táblázat: 1% illóolajat tartalmazó Lypogel kenőcs alapból adott időpontokban kioldódott és mérhető mennyiségű komponensei.

Lipogel + 1%	
Mintavétel ideje	Mért komponensek a mintában
30 perc	Nem azonosítható komponens a mintában.
60 perc	Nem azonosítható komponens a mintában.
90 perc	Nem azonosítható komponens a mintában.
120 perc	Nem azonosítható komponens a mintában.
300 perc	Megjelent a β -kariofillén (2%), emellett a nem azonosítható komponens a mintában.

15. táblázat: 1% illóolajat tartalmazó Vaselineum kenőcs alából adott időpontokban kioldódott és mérhető mennyiségű komponensei.

Vaselineum + 1 %	
Mintavétel ideje	Mért komponensek a mintában
30 perc	Nem azonosítható komponens a mintában.
60 perc	Nem azonosítható komponens a mintában.
90 perc	Nem azonosítható komponens a mintában.
120 perc	Nem azonosítható komponens a mintában.
300 perc	Megjelent a borneol (2%), emellett a nem azonosítható komponens a mintában.

7. FEJEZET: Génexpressziós vizsgálatok

1. A tanulmány célja

B. thuringiensis baktérium fertőzésre adott génexpressziós változások teljes transzkriptom vizsgálata:

- indiai citromfű illóolaj hatására bekövetkezett génexpressziós változások nyomon követése
- ezen változások összevetése eritromycin (antibiotikum kontroll) hatására bekövetkezett változásokkal

2. Anyagok és módszerek

2.1. A kísérlethez felhasznált baktérium és tenyésztési körülményei

B. thuringiensis baktérium overnight kultúrájából 10-10 µl-eket oltottunk be 60 ml LB tápfolyadékot tartalmazó lombikokba, majd logos fázis eléréséig növesztettük őket rázó termosztátban.

2.2. Indiai citromfű megfelelő koncentrációjának kiválasztása

Overnight baktérium tenyészetből 10-10 µl-t beoltottunk 4 db 60 ml LB tápfolyadékot tartalmazó lombikba, majd 37 °C-on történő ~4 órás inkubációt követően kezdeti csíraszámot határoztunk meg. Ezután az indiai citromfű illóolajából 5; 10 és 15 µl került az egyes lombikokba; negyedik lombik szolgált baktérium kontrollként. Együtt inkubáltuk a lombikokat 37 °C-on, majd mintavétel és csíraszám-meghatározás történt 15 perc, 30 perc, 1 óra és 1,5 óra múlva. A kapott CFU értékeket grafikonon ábrázoltuk az idő függvényében (**16. ábra**).

2.3. Eritromycin megfelelő koncentrációjának kiválasztása

Overnight baktérium tenyészetből 10-10 µl-t beoltottunk 4 db 60 ml LB tápfolyadékot tartalmazó lombikba, majd 37 °C-on történő ~4 órás inkubációt követően kezdeti csíraszámot határoztunk meg. Ezután az indiai citromfű illóolajából 15 µl került az egyik lombikba; két másik lombikba 150, illetve 300 µl eritromycin (30 mg/ml-es törzsoldatból); a negyedik lombik szolgált baktérium kontrollként. Együtt inkubáltuk a lombikokat 37 °C-on, majd mintavétel és

csíraszám-meghatározás történt 15 perc, 30 perc és 1 óra múlva. A kapott CFU értékeket grafikonon ábrázoltuk az idő függvényében (17. ábra).

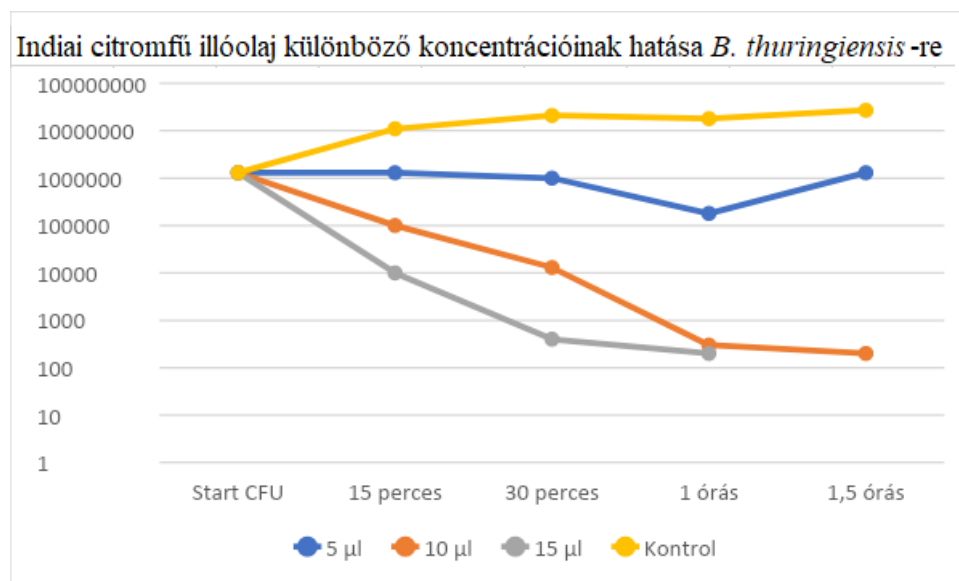
2.4. RNS izolálás

B. thuringiensis overnight kultúrájából logos fázist indítottunk. Megfelelő csíraszám elérését ($OD_{600}=0.2$) követően mintát vettünk a 0. időpontban RNS izoláláshoz, melynek meghatároztuk kezdeti CFU értékét. Ezután egy lombikba 15 μ l indiai citromfüvet mértünk; egy másikba 300 μ l eritromycin (30 mg/ml) került. Ezen kívül volt még egy, csak baktériumot tartalmazó lombik (kontroll). Hét perces, illetve 15 perces inkubációt követően 20-20 ml mintát vettünk a lombikokból és minden időpontban meghatároztuk a csíraszámot, illetve elindítottuk az RNS izolálást. A megadott időpillanatban vett mintákat lefugáltuk (4 perc, 8000 rpm) és mostuk 1-1 ml RNAprotect® Bacteria Reagent oldattal (Qiagen). Alapos vortexelés után legalább 5 percig hagytuk mindegyik csövet inkubálni. Centrifugálást követően az RNAprotect oldatot tartalmazó felülúszót pipettával óvatosan leszívtuk. Ezután 200 μ l lizozim oldatot (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/ml lizozim) adtunk a csövekhez, majd alapos vortexelést követően 30 percig szobahőn inkubáltuk őket. A csövek tartalmát minden 10 percben ismét összevortexeltük. Proteináz K oldatból (20 mg/ml) 20 μ l-t adtunk mindegyik csőhöz, majd 10 percig szobahőn inkubáltuk őket. Az inkubációs idő lejárta után 700 μ l RLT puffert (Qiagen) pipettáztunk a csövekhez, melyhez 7 μ l β -merkaptóetanolt is adtunk. Centrifugálást követően 500 μ l felülúszóhoz 500 μ l jéghideg 96%-os etanolt adtunk, majd óvatosan fel-le forgatva a csöveket, összekevertük tartalmukat. 700 μ l mennyiségű mintákat Qiagen oszlopokra vittünk, majd rövid fugálási lépés után (1 perc, 8000 xg) mostuk a mintákat 500 μ l RPE (Qiagen) oldattal (2x). A mosási lépések után 8000 xg-n lefugáltuk a csöveket (15 sec). Végül csináltunk egy leoldás előtti mosófolyadék mentesítést (fuga: 1 perc, 8000 xg), majd 50 μ l DEPC-el kezelt vízzel leoldottunk mintáinkat (inkubáció szobahőn: 1 perc, majd fuga: 1 perc, 8000 xg).

3. Eredmények

3.1. Indiai citromfű illóolaj megfelelő koncentrációjának kiválasztása

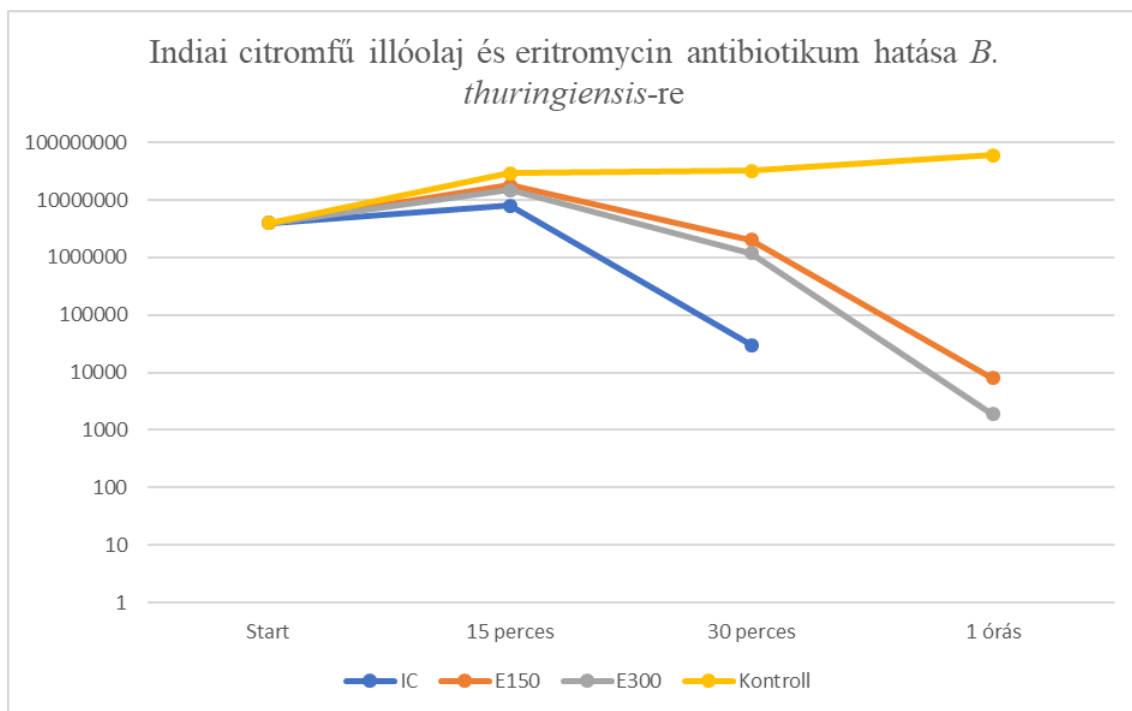
A **16. ábra** mutatja az indiai citromfű illóolaj különböző koncentrációinak antibakteriális hatását 1,5 órás időtartamot figyelembe véve. A grafikonon az látszik, hogy az illóolaj 5 µl-es koncentrációban csak 30 perc elteltével csökkenti kis mértékben a csíraszámot. A 15 µl-es mennyiség ezzel szemben jelentős mértékű CFU csökkenést mutat már az első időpontban (15 perc) vett minta esetén.



16. ábra: Indiai citromfű illóolaj különböző koncentrációinak hatása *B. thuringiensis* baktérium növekedésére.

3.2. Eritromycin megfelelő koncentrációjának kiválasztása

A 17. ábra mutatja, hogyan hat az indiai citromfű illóolaj (15 µl) és az eritromycin (150 és 300 µl) *B. thuringiensis* baktériumra. Láthatjuk, hogy az eritromycin két különböző koncentrációja között nincs sok eltérés és antibakteriális hatásuk nem nagy mértékben különbözik az illóolaj hatásától. Ebből kifolyólag következő kísérletünkben így a két eltérő antimikrobás anyag (IC és az antibiotikum) hatása ezen koncentrációkban összevethető egymással.



17. ábra: Indiai citromfű illóolaj és eritromycin antibiotikum két különböző koncentrációjának hatása *B. thuringiensis*-re.

3.3. Teljes transzkriptomi analízis eredményei az indiai citromfű és kontroll, illetve az indiai citromfű és eritromycin vonatkozásában összehasonlítva

A teljes transzkriptomi vizsgálatok megmutatták, hogy a *Bacillus thuringiensis* 5054 génjéből 2109 gént érintett az indiai citromfű hatására létrejövő környezeti tényező változása. Ebből 986 gén átírása leszabályozódott, míg 1123 gén esetében növelt expressziót tapasztaltunk. A nyert adatok számos későbbi, az indiai citromfű antibakteriális hatását alaposabban elemző vizsgálat alapját képezheti, de ezen munka keretében a nyert előzetes eredményeinket csak két fő funkcióra korlátozzuk (**16. táblázat**). Ebből kitűnik, hogy az általános stressz gének fokozott expressziója tapasztalható a 7-ik és a 15. percben. A válasz a 15. perc esetében a 7. perchez képest sokszor drasztikusan emelkedik (WP_000557321.1; WP_000448820.1; WP_000522903.1). Emellett a sporulációt befolyásoló gének leszabályozódása a kontrolhoz képest inkább csak a 15 percben nyilvánul meg. Ezek érintettsége nem azonos mértékű. Emellett a számos transzkripciós és transzlációs faktor transzkripciója is befolyásolt eltérő mértékben és előjellel.

16. táblázat: Az indiai citromfű, *Bacillus thuringiensis* génexpressziójára gyakorolt hatása az expozíció 7. és 15. percében a kezeletlen kontroll minta expressziós értékeihez hasonlítva.

kategória	gén neve	a fehérje referenciája	expresszió 7; illetve 15 percnél a kontrollhoz képest
Stresszének	BA3454 family stress response protein	WP_000573532.1	4,9x; 5,7x
	general stress protein	WP_000557321.1	9,4x; 217,3x
	general stress protein	WP_001100088.1	10,2x; 30,8x
	general stress protein	WP_000448820.1	21,2x; 92,5x
	GlsB/YeaQ/YmgE family stress response membrane protein	WP_000522903.1	35,5x; 125,2x
Sporulációt befolyásoló gének	sporulation protein	WP_000486630.1	-; -5x
	stage VI sporulation protein F	WP_000369753.1	-; -4,7x
	<i>sirA</i>	WP_000860652.1	-; -3,2x
	stage V sporulation protein S	WP_000427801.1	-; 3,2x
	<i>spoIIIM</i>	WP_013142149.1	-; 4,2x
	YjcZ family sporulation protein	WP_000540375.1	-; 35,3x
	<i>spoIIIAC</i>	WP_000020914.1	-; 35,3x
	<i>gerPD</i>	WP_001052807.1	-; -64,8x;
	<i>gerE</i>	WP_000659484.1	-; 6x

17. táblázat: Az indiai citromfű, *Bacillus thuringiensis* génexpressziójára gyakorolt hatása az expozíció 7. és 15. percében az eritromycinnel kezelt minta expressziós értékeihez hasonlítva.

kategória	gén neve	a fehérje referenciája	expresszió 7; illetve 15 percnél eritromycinhez képest
Stresszgének	<i>sodA</i>	WP_001052040.1	5,3x; 10,4x
	<i>etfA</i> és <i>etfB</i>	WP_000101946.1 és WP_001029028.1	7,2x; 8,7x
	<i>sdhC</i>	WP_000678354.1	3,2x; 3,7x
	<i>cspC</i>	WP_001990088.1	-; 3,7x
	<i>cspD</i>	WP_000176366.1	-; 3,4x
Sporulációt befolyásoló gének	<i>spoVM</i>	WP_001213599.1	-9,6x; -35,4x
	<i>spoIVFB</i>	WP_000599064.1	-3,9x; -3,5x
	<i>sirA</i>	WP_000860652.1	-; -4x
	<i>Ger(x)C</i>	WP_000619980.1	-; -4,4x
	<i>YjcZ</i>	WP_000505681.1	-5x; -6,9x
	Spore germination protein	WP_002062565.1	-; -4,3x

8. FEJEZET: Diszkusszió

Munkánk során indiai citromfű antibakteriális hatását vizsgáltuk olyan baktériumok esetén, melyek összefüggésbe hozhatók a pitted keratolízis nevű felszíni bőrfertőzéssel. E tulajdonsága révén az illóolaj-bázisú gélek és kenőcsök lehetséges terápiás jelöltek (Shukr és Metwally, 2013). A tanulmányunk során alkalmazott 12 illóolajat korábbi publikációk alapján választottuk ki, melyekben leírták ezen illóolajok antibakteriális sajátságait (Moore-Neibel és mtsai, 2011; Berthold Pluta és mtsai, 2019; Oulkheir és mtsai, 2017; Cui és mtsai, 2015; Shahbazi, 2015; Al Zuhairi és mtsai, 2020; Timung és mtsai, 2016; Thosar és mtsai, 2013; Soetjipto, 2018; Damjanovic Vratnica és mtsai, 2011). A pitted keratolízis ismert etiológiai ágenseinek (*B. thuringiensis*, *K. sedentarius*, *D. congolensis*) érzékenysége vonatkozóan még nincsenek irodalmi adatok.

A kicseppentéses antibakteriális tesztek eredményei azt mutatták, mind a tizenkét illóolaj összehangban a szakirodalmi adatokkal antibakteriális hatással rendelkezett, de ennek mértéke eltérő volt. A legkifejezettebb hatás az indiai citromfű, a fahéj és a kakukkfű esetében volt tapasztalható (**8. ábra**). A tesztelt illóolajok antibakteriális potenciálja a MIC és MBC értékek meghatározásával is meg lett erősítve. Makrodilúciós teszteket végeztünk, azonban néhány esetben a tesztelt illóolajok hatékonysága közt az ezen és az előző rendszerben mért eredményeket tekintve eltérés volt megfigyelhető. Ez valószínűleg a két módszer különböző jellegzetességének tudható be, lévén a táptalajra cseppentése módszer egy direkt kontakt alapú, míg a MIC MBC folyadékfázisú. Ennek ellenére nagy gátlási zónák (>25 mm) és az alacsony MIC értékek (0,1 mg/ml) összefüggenek irodalmi adatokkal kakukkfű esetén (Messaoudi és mtsai, 2019), amely esetben az erős antimikrobás hatás a magas fenolos komponens tartalomnak köszönhető, mint a timol és karvakrol. Ezen komponensek >40%-át alkotják ezen illóolajnak (Sienkiewicz és mtsai, 2012). Kacániová és mtsai (2021) korábban leírták a fahéj illóolajának nagymértékű hatásosságát *B. subtilis*-sel szemben, ahol a MIC érték 0,1 mg/ml volt, hasonlóan eredményeinkhez a három vizsgált baktériumnál. Ebben az esetben a fahéjaldehyd és az eugenol, a fahéj illóolaj fő komponensei felelősek az antibakteriális aktivitásért (Gende és mtsai, 2008).

Indiai citromfű illóolaj alacsony gátló koncentrációt (0,13 mg/ml) jegyeztek fel Aiemsaard és mtsai (2011) egy másik, nagyon közeli *Bacillus* fajjal a *B. cereus*-sal szemben, mely érték szintén összehangban van saját eredményünkkel, amit saját *B. thuringiensis* izolátumunk esetén mértünk.

Tanulmányunkban a három leghatásosabb baktericid illóolaj közül az indiai citromfű illóolajat választottuk ki további analízisre a következő gyakorlati megfontolások miatt: habár egy mostani tanulmány azt mutatja, hogy fahéj, kakukkfű és indiai citromfű illóolajok egyaránt képesek csökkenteni *B. subtilis* életképes spóráinak számát, ez a hatás az indiai citromfű illóolaj esetében volt a legkifejezettebb (Lawrence és Palombo, 2009; Salem és mtsai, 2018). Ezenkívül a fahéj esetében a kontakt dermatitis lehetőségével kell számolni (Calnan, 1976), egy esetleges későbbi gyakorlati felhasználás során.

A kiválasztott indiai citromfű illóolaj GC-MS analízisével kapott százalékalapú komponens összetételi eredmény összehangban van korábbi tanulmányokkal (Lee és mtsai, 2020; Hanaa és mtsai, 2012; Al Naqqash és mtsai, 2019). Egy korábbi publikációban olvashatjuk, hogy a nyugat-indiai citromfű illóolaj (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) ~77%-ban tartalmaz citrál. A természetes citrál két geometriai izomer keveréke: geraniál (citrál a, ϵ - vagy α -citrál) és nerál (citrál b, (Z)- vagy β -citrál). A nyugat-indiai citromfű illóolajának esetében százalékos megoszlásuk rendszerint a következő: geraniál 36,7–55,9% és nerál 25,0–35,2% (Tisserand és Young, 2014). Hasonlóan, a mi eredményeink alapján a nerál 26,1% és a geraniál 34,5%-át alkotja az illóolajnak. Általánosságban néhány eltérés kétségtelen illóolaj komponens összetételek között publikációkban több faktornak köszönhetően, mint például földrajzi elhelyezkedés és hőmérséklet (Dhifi és mtsai, 2016; Barra, 2009).

Nem meglepő, hogy a citrál mutatott karakterisztikus gátlási zónát a bioautográfias szilika lemezen (fehér foltok a **12. és 13. ábrán**), mivel ezen tulajdonságát már korábban is leírták más baktériumfajok esetében (Falcao és mtsai, 2012). Saját eredményeink tovább erősítik azt, hogy az indiai citromfű illóolaja hatásos idáig még nem jellemzett baktériumfajokkal szemben, beleértve a pitted keratolízis eddig leírt kórokozóit is. Az eddig ismert fajok mellett igaz ez az általunk legutóbb leírt kórokozó ágensre a *Bacillus thuringiensis*-re is, mely a legellenállóbb, lévén spórázásra képes baktérium. Ez egy érdekes aspektusát vetíti fel az epidemiológiai adatoknak, visszautalva a bevezetőben leírt tényekre. Eszerint, habár az utóbbi években néhány tanulmány el kezdett foglalkozni egyes szélesebb társadalmi csoportok, foglalkozások (katonák, sportolók, mezőgazdasági munkások, stb.) körében leírt pitted keratolízis előfordulási gyakoriságával és a terápia esetleges kudarcával, visszatérő jellegével (Kaptanoglu és mtsai, 2012), kevés hangsúly fektetődött a kórokozó ágensek azonosítására. Egyik publikációnkban (Schneider és mtsai, 2021) pont erre került sor, ahol a egy spóráképző környezeti izolátum került képbe, mely spóráképző tulajdonsága miatt magyarázatot adhat a terápiát követő rövid időn belüli visszatérésre. E tekintetben egy indiai citromfű alapú kenőcs egyrészt spóragátló tulajdonsága révén kiválthatja az eddigi lokális és antibiotikum (döntően

eritromicin és clindamycin) tartalmú kenőcsök használatát ezen fertőzés megszüntetésében.

Abból a célból, hogy feltárjunk más lehetséges antibakteriális hatású komponenszt az indiai citromfű illóolajában, HS-SPME/GC-MS analízist alkalmaztunk. Az SPME módszer szemben a gőzdesztillációval, alacsonyabb hőmérsékleten működik, ami azt jelenti, hogy a komponensek nem bomlanak le vagy alakulnak át és több illékony komponens aránya nő a kevésbé illékony komponensekhez képest (An és mtsai, 2001).

Az indiai citromfű antibakteriális hatásának kifejtésében a citrál mellett az α -terpineol is hozzájárulhat az antibakteriális hatás kifejtésében, habár ezen utóbbi komponens százalékos aránya jóval kisebb, mint magáé a főkomponensé. Arról, hogy hatásuk szinergista vagy éppen antagonista, szintén nincs információnk. Sajnos nem tudtuk meghatározni, hogy vajon a γ -kadinén és kalamén antibakteriális tulajdonságúak-e, hiszen ezen komponensek preparációjára kooperációs partnereink sem voltak felkészülve és egyetlen számunkra ismert illóolaj komponens forgalmazónál sem voltak elérhetőek. Ebből kifolyólag nem tudjuk pontosan megmondani, hogy ezen komponensek szintén hozzájárulnak-e az antibakteriális hatáshoz vagy sem (**12C(4), D(4) és 13C(4) ábra**). További tanulmányok szükségesek a kérdés tisztázása végett.

Antibakteriális hatással biztosan rendelkező komponensek (citrál és α -terpineol) gátlási zónáit és MIC MBC értékeit összehasonlítottuk. Összességében az alacsony MIC és MBC értékek (0.1 mg/ml) a három tesztelt baktériumnál (**9. táblázat**), megerősítették a citrál erős antibakteriális aktivitását, hasonlóan *B. cereus*-sal végzett kísérletben, ahol 0.15 mg/ml-es értéket kaptak (Aiemsard és mtsai, 2011). Az α -terpineol jóval gyengébb antibakteriális hatást produkált, mint azt a százalékos arányából már következtetni lehetett.

Dolgozatom keretében céлом volt annak eldöntése is, hogy az indiai citromfű alapú vizsgálataink eredményei átültethetők-e a gyakorlat síkjára. Ehhez végeztük el a különféle alapkenőcsökbe történő hatóanyag keverést és hajtottuk végre az *in vitro* antibakteriális teszteket. Az antibakteriális tesztek már megmutatták, hogy a hydrogel alap jóval karakteresebb hatást képes kiváltani, míg ezzel szemben a hidrofób kenőcs alapokba (lipogel és vaselinum) kevert IC nem hatékony. Ennek oka abban keresendő, hogy az IC illóolajának döntően hidrofób komponensei fogságba ejtődnek a kenőcs mátrix anyagában és így nem képesek az antibakteriális hatás kiváltására. Ezzel szemben a Hydrogel kenőcs alapban emulgeált komponensek nem ragaszkodtak a kenőcs mátrixhoz és ezzel a táptalajra szélesztett baktérium gypén a kenőcsöt könnyebben elhagyták és antibakteriális hatásukat kifejthették.

Ezt alátámasztandó a következő lépésben hajtottuk végre a bőrpenetrációs kísérletet, mely

megmutatta, hogy az IC komponensei jóval nagyobb arányban és rövidebb idő alatt oldódtak ki a Hydrogél kenőcs alapból, mint a hidrofób alapok esetében (**13. táblázat**).

Eredményeink rámutatnak, hogy az indiai citromfű alapú kenőcsök gyakorlati felhasználása esetén preferált lehet a Hydrogel használata és valószínűleg általánosságban véve a hidrofil kenőcs alapok használata.

Ezen eredményeink jelentősége abban áll, hogy bizonyos esetekben (pl.: bőrfelszíni fertőzések esetén) az antibiotikum tartalmú kenőcsök kiválthatók illóolaj tartalmú terápiás szerekkel, csökkentve ezzel a környezetbe kerülő antibiotikumok mennyiségét és kismértékben ugyan, de hozzájárulva azon evolúciós nyomás csökkentéséhez, mely az antibiotikum-rezisztencia terjedésének egyik hajtóereje.

Közismert tény, hogy az eltérő körülmények közé kerülő baktériumok bizonyos stresszválaszokkal reagálnak (Dawan és Ahn, 2022). Ezen válasz mértéke függ az környezeti változás minőségétől. A *Bacillus thuringiensis* 5054 génből álló genomjának 2109 gén transzkripcióját érintő stresszhelyzet fémjelzi, hogy az indiai citromfű illóolajának környezeti megjelenése megbolygatja a normális transzkripciót. Ezt a helyzetet az általános stressz gének transzkripciójának drasztikus felszabályozódása jellemzi, ami arra utal, hogy a baktérium egy általános stressz válasszal próbál reagálni, amely az idő függvényében drasztikusan fokozódik is. Tudván azt, hogy az illóolajok legfontosabb támadáspontja a sejtmembrán, és annak integritása kritikus az alapvető funkciókat befolyásoló ozmotikus állapotok fenntartásában, nem meglepő, hogy a válasz a stressz kezelésben résztvevő membránfehérjék termelődését is érinti. A felfokozott stresszhelyzet a sejt számára egy drasztikus átprogramozódási folyamat, melyben a különböző transzkripciós és translációs faktorok is erősen érintettek. Ez a legrelevánsabb gének listájából is kitűnik (**4. sz. melléklet**).

A transzkriptomi eredmények egy alaposabb analízist tesznek lehetővé a két különböző antimikrobás hatású anyag (indiai citromfű illóolaj és eritromycin) összehasonlító vizsgálatánál. Jelen munkánk esetében csak egy-két aspektusra koncentráltunk, mint a stressz és a sporuláció. Az összehasonlítás azért lehet érdekes, mert a két anyag más más antimikrobás hatással bír, lévén még az eritromycin mint egy komponensű antibiotikum az 50S riboszóma 23S alegységéhez köthet és ezzel a translációt gátolhatja érzékeny mikrobák esetén, addig az indiai citromfű mint több komponensű illóolaj többféle módon fejtheti ki hatását.

A tradicionális elgondolás alapján az illóolajok membránkárosító hatással rendelkeznek és jelenlétében a baktériumok egyfajta oxidatív stresszt szenvednek el. A szuperoxid dizmutáz (*sodA*, WP_001052040.1) gén eritromycin kezeléshez képest megnövekedett szintje, erről tanúskodik. A stressz szituációt a korábban leírt *cspC* (WP_001990088.1) szintjének megemelkedése is alátámasztja, habár ezen gén termékének szerepét korábban hideggel kapcsolatos stresszhelyzetekkel hozták kapcsolatba. Ezzel szemben a *cspD* (WP_000176366.1) szintje növekedést mutatott, ami a szakirodalmi adatok alapján működik (Yamanaka és mtsai, 2001) nem meglepő, lévén ellentétes kifejeződést mutat a *cspC* génnel. Az indiai citromfű okozta stresszhelyzet valószínűleg a membrán károsítása miatt egyfajta energia krízisbe sodorja a baktériumsejtet, amit a megnövekedett citokróm (*sdhC*, WP_000678354.1) termeléssel, illetve az elektrontranszportban résztvevő flavoproteinek (*etfA* és *etfB*; WP_000101946.1 és WP_001029028.1) megnövekedett szintjével próbál ellensúlyozni az a baktériumsejt.

Spóragátlást demonstráló eredményeink alapján nem meglepő, hogy a spóráképzésben résztvevő gének, expressziócsökkenést mutattak. Az ezen folyamatot befolyásoló több gén *spoVM*, *spoIVFB*, *sirA*, *Ger(x)C* family protein, *YjcZ* érintettsége arra utalhat, hogy esetleg egy közös regulátort befolyásol az indiai citromfű valamely komponense vagy komponensei. Ez ellen szól, hogy az expresszió befolyásoltság mértéke nem ugyanaz, ugyanis, míg a IV-es stációban résztvevő *spoIVFB* szintje mind a 7. mind a 15. percnél csak 3x leszabályozottságot mutat az eritromycinnel kezelt mintához képest, ez az érték -9x-es, illetve -35x-ös az 5. germinációs stációban résztvevő *spoVM* gén esetében. Ez arra utalhat, hogy a spóráképzése génregulációs kaszkád 5. lépése előtti érintettsége nagyobb mint az előzőeké.

8. FEJEZET: Irodalomjegyzék

1. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016; 2016:3012462.
2. Naik MI, Fomda BA, Jaykumar E, Bhat JA. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2010; 535-538.
3. Shi C, Sun Y, Liu Z, Guo D, Sun H, Sun Z, *et al.* Inhibition of *Cronobacter sakazakii* virulence factors by citral. *Scientific Reports*, 2017; 7:43243.
4. Singh G, Naik CL. Pitted keratolysis. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 2005; 71:213-215.
5. Leeyaphan C, Bunyaratavej S, Taychakhoonavudh S, Kulthanachairojana N, Pattanaprichakul P, Chanyachailert P, *et al.* Cost-effectiveness analysis and safety of erythromycin 4% gel and 4% chlorhexidine scrub for pitted keratolysis treatment. *Journal of Dermatological Treatment*, 2019; 30:627-629.
6. Bunyaratavej S, Leeyaphan C, Chanyachailert P, Pattanaprichakul P, Ongsri P, Kulthanan K. Clinical manifestations, risk factors, and quality of life in pitted keratolysis: A cross-sectional study in cadets. *British Journal of Dermatology*, 2018; 179:1220-1221.
7. Law RWY, So E, Chu AKC, Logan DB. Pitted keratolysis: a case report and review of current literature. *Proceedings of Singapore Healthcare*, 2019; 28:71–73.
8. Kaptanoglu AF, Yuksel O, Ozyurt S. Plantar pitted keratolysis: a study from non-risk groups. *Dermatology Reports*, 2012; 4:e4.
9. Leung AKC, Barankin B. Pitted keratolysis. *Journal of Pediatrics*, 2015; 167:1165.
10. Carmona-Cruz S, Orozco-Covarrubias L, Sáez-de-Ocariz M. The human skin microbiome in selected cutaneous diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022; 12:834135.
11. Boxberger M, Cenizo V, Cassir N, La Scola B. Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome*, 2021; 9:125.
12. Kárpáti S, Kemény L, Remenyik É. *Bőrgyógyászat és Venerológia*, 2013;
13. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 2013; 9:244–253.
14. Sanford JA, Gallo RL. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Seminars in Immunology*, 2013; 25:370–377.
15. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nature Reviews*

Microbiology, 2018; 16:143-155.

16. McLoughlin IJ, Wright EM, Tagg JR, Jain R, Hale JDF. Skin Microbiome – The Next Frontier for Probiotic Intervention. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2022; 14:630-647.
17. Dréno B, Araviiskaia E, Berardesca E, Gontijo G, Sanchez Viera M, Xiang LF, *et al.* Microbiome in Healthy Skin, Update for Dermatologists. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2016; 30:2038–2047.
18. Cole C, Gazewood J. Diagnosis and treatment of impetigo. *American Family Physician*, 2007; 75:859-864.
19. Motswaledi MH. Superficial skin infections and the use of topical and systemic antibiotics in general practice. *South African Family Practice*, 2011; 53:139-142.
20. Laureano AC, Schwartz RA, Cohen PJ. Facial bacterial infections: Folliculitis. *Clinics in Dermatology*, 2014; 32:711-714.
21. Kalra MG, Higgins KE, Kinney BS. Intertrigo and secondary skin infections. *American Family Physician*, 2014; 89:569-573.
22. Riquelme IL, Moyano EG. Axillary and inguinal erythrasma. *Canadian Medical Association Journal*, 2021; 193:E1535.
23. Pinto M, Hundi GK, Bhat RM, Bala NK, Dandekeri S, Martis J, *et al.* Clinical and epidemiological features of coryneform skin infections at a tertiary hospital. *Indian Dermatology Online Journal*, 2016; 7:168-173.
24. Tilgen. Pitted Keratolysis (Keratolysis Plantare Sulcatum). *Journal of Cutaneous Pathology*, 1979; 6:18-30.
25. Castellani A. Keratoma plantare sulcatum. *Journal of Ceylon British Medical Association*, 1910; 1:12-14.
26. Zaias N. Pitted and ringed keratolysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1982; 7:787-791.
27. Acton HW, McGuire C. Actinomycotic lesions of the skin of the hands and feet due to *Actinomyces keratolytica*, n. sp. *The Indian Medical Gazette*, 1931; 66:65–70.
28. Stollsteiner S, Chung S, Laganier J, Tan A, Brun C, Ducasse V, *et al.* A story of hands and smelly feet. *European Geriatric Medicine*, 2016; 7:100–101.
29. Dhitavat J, Bussaratid V, Choovichian V, Tunyong W, Chanket P. Pitted keratolysis during flooding in Thailand. *International Society for Infectious Diseases*, 2012; 16:e217.
30. Kim BJ, Park KU, Kim JY, Ahn JY, Won CH, Lee JH, *et al.* Comparative study of benzoyl peroxide versus clindamycin phosphate in treatment of pitted keratolysis. *Korean journal of medical mycology*, 2005; 10:144-150.

31. Chaudhary D, Finkle SN. Peritoneal dialysis-associated peritonitis due to *Kytococcus sedentarius*. *Peritoneal Dialysis International*, 2010; 30:252-253.
32. Longshaw CM, Wright JD, Farrell AM, Holland KT. *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 2002; 93:810–816.
33. Chan JFW, Wong SSY, Leung SSM, Fan RYY, Ngan AHY, To KKW, *et al.* First report of chronic implant-related septic arthritis and osteomyelitis due to *Kytococcus schroeteri* and a review of human *K. schroeteri* infections. *Infection*, 2012; 40:567– 573.
34. ZoBell CE, Upham HC. A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bulletin Scripps Institution of Oceanography University of California (Technical Series)*, 1944; 5:239–292.
35. Kloss WE, Tornabebe TG, Schleifer KH. Isolation and characterization of *Micrococci* from human skin, including two species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1974; 24:79-101.
36. Kaźmierczak AK, Szarapińska-Kwaszewska JK, Szewczyk EM. Opportunistic coryneform organisms--residents of human skin. *Polish Journal of Microbiology*, 2005; 54:27-35.
37. Shelley WB, Shelley ED. Coexistent erythrasma, trichomycosis axillaris and pitted keratolysis: An overlooked corynebacterial triad? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1982; 7:752-757.
38. Heid E, Cribier B, Koessler A. Cutaneous corynebacterioses. *Annals of Dermatology and of Venereology*, 1994; 121:855-858.
39. Hartmann AA. The influence of various factors on the human resident skin flora. *Seminars in Dermatology*, 1990; 9:305-308.
40. Alejo-Cancho I, Bosch J, Vergara A, Mascaro JM, Marco F, Vila J. Dermatitis by *Dermatophilus congolensis*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2015; 21:e73–e74.
41. Burd EM, Juzych LA, Rudrik JT, Habib F. Pustular dermatitis caused by *Dermatophilus congolensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007; 45:1655–1658.
42. Valour F, Sénéchal A, Dupieux C, Karsenty J, Lustig S, Breton P, *et al.* Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infection and Drug Resistance*, 2014; 7:183–197.
43. Waksman SA, Schatz A, Reynolds DM. Production of antibiotic substances by actinomycetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010; 1213:112–124.
44. Sarmiento-Vizcaíno A, Espadas J, Martín J, Braña AF, Reyes F, García LA, *et al.* Atmospheric precipitations, hailstone and rainwater, as a novel source of *Streptomyces*

producing bioactive natural products. *Frontiers in Microbiology*, 2018; 9:773.

45. Ribeiro da Cunha B, Fonseca LP, Calado CRC. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? *Antibiotics*, 2019; 8:45.

46. Quinn GA, Banat AM, Abdelhameed AM, Banat IM. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of Medical Microbiology*, 2020; 69.

47. Sehgal VN, Ramesh V. Crateriform depression - an unusual clinical expression of pitted keratolysis. *Dermatologica*, 1983; 766:209-211.

48. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 2017; 33:300– 305.

49. Centers for Disease Control and Prevention, 2013

50. Read AF, Woods RJ. Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2014; 2014:147.

51. The antibiotic alarm. *Nature*, 2013; 495:141.

52. Luyt CE, Bréchet N, Trouillet JL, Chastre J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Critical Care*, 2014; 18:480.

53. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 2013; 56:1445-1450.

54. Lushniak BD. Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health Reports*, 2014; 129:314-316.

55. Viswanathan VK. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes*, 2014; 5:3- 4.

56. Agyeman WY, Bisht A, Gopinath A, Cheema AH, Chaludiya K, Khalid M, *et al.* A systematic review of antibiotic resistance trends and treatment options for hospital acquired multidrug-resistant infections. *Cureus*, 2022; 14:e29956.

57. Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems-A review. *Food Control*, 2015; 54:111-119.

58. van de Braak SAAJ, Leijten GCJJ. Essential oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union; CBI, Centre for the Promotion of Imports from developing countries: Rotterdam, The Netherlands, 1999; p. 116.

59. Atanasova T, Kakalova M, Stefanof L, Petkova M, Stoyanova A, Damyanova S, *et al.* Chemical composition of essential oil from *Rosa Damascena* mill., growing in new region of Bulgaria. *Ukrainian Food Journal*, 2016; 5:492-498.

60. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004; 94:223–253.

61. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008; 46:446-475.
62. Novak J, Draxler L, Goehler I, Franz CM. Essential oil composition of *Vitex agnus castus* comparison of accessions and different plant organs. *Flavor and Fragrance Journal*, 2005; 20:186-192.
63. Olawore NO, Ogunwande IA, Ekundayo O, Adeleke KA. Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.). *Flavour and Fragrance Journal*, 2005; 20:54–56.
64. Theis N, Lerchau M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 2003; 164.
65. Badi HN, Yazdani D, Mohammad Ali S, Nazari F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 2004; 19:231–236.
66. Fathi E, Sefidkon F. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Eucalyptus sargentii*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2012; 14:1035-1042.
67. Bauer H, Lele Z, Rauch GJ, Geisler R, Hammerschmidt M. The type I serine/threonine kinase receptor Alk8/Lost-a-fin is required for Bmp2b/7 signal transduction during dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, 2001; 128:849-858.
68. Günther E. The essential oils: History and origin in plants production analysis. *Krieger Publishing, New York*, 1948; 235-240.
69. Crosthwaite D. UK trade within the flavour and fragrance industry, in: International Federation of Essential Oils and Aroma Trades – 21st International Conference on Essential Oils and Aroma's. London 1998. *London, IFEAT*, 1998; 6–12.
70. Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, 1993; 16:49-55.
71. Boyle W. Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review*, 1955; 66:25-28.
72. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013; 6:1451–1474.
73. Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; 53:2511–2517.

74. Campos J, Schmeda-Hirschmann G, Leiva E, Guzmán L, Orrego R, Fernández P, *et al.* Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein. *Food Chemistry*, 2014; 151:175–181.
75. Fernandes CN, De Souza HF, De Oliveria G, Costa JGM, Kerntopf MR, Campos AR. Investigation of the mechanisms underlying the gastroprotective effect of *Cymbopogon Citratus* essential oil. *Journal of Young Pharmacists*, 2012; 4:28–32.
76. Meenapriya M, Priya J. Effect of lemongrass oil on rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2017; 9:237-239.
77. Gardner Z, McGuffin M. (Eds.). *American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook (2nd ed.)*. CRC Press. 2013.
78. Vazirian M, Kashani ST, Ardekani MRS, Khanavi M, Jamalifar H, Fazeli MR, *et al.* Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) essential oil against food-borne pathogens added to cream-filled cakes and pastries. *Journal of Essential Oil Research*, 2012; 24:579-582.
79. Silva Cde B, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008; 12:63-66.
80. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 1999; 86:985–990.
82. Aiensaard J, Aiumlamai S, Aromdee C, Taweechaisupapong S, Khunkitti W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Research in Veterinary Science*, 2011; 91:e31–e37.
83. Friedman M, Ibrahim H, Bass L. Clinical staging for sleep-disordered breathing. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 2002; 127:13-21.
84. Maizura M, Fazilah A, Norziah MH, Karim AA. Antibacterial activity of modified sago starch-alginate based edible film incorporated with lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil. *International Food Research Journal*, 2008; 15:233-236.
85. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016; 6:71–79.
86. Lawrence HA, Palombo EA. Activity of essential oils against *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009; 19:1590–1595.
87. Horváth Gy, Jámbor N, Kocsis E, Böszörményi A, Lemberkovic É, Héthelyi É, *et al.* Role

of direct bioautographic method for detection of antistaphylococcal activity of essential oils. *Natural Product Communications*, 2011; 6:1379-1384.

88. Schaneberg BT, Khan IA. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemongrass by GC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50:1345-1349.

89. Teuscher E. *Medicinal Spices – A Handbook of Culinary Herbs, Spices, Spice Mixtures and Their Essential Oils*, Stuttgart, Germany: Medpharm Scientific Publishers, 2006.

90. Long N, Tang H, Sun F, Lin L, Dai M. Effect and mechanism of citral against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019; 99:4423–4429.

91. Zhang Y, Wei J, Chen H, Song Z, Guo H, Yuan Y, *et al.* Antibacterial activity of essential oils against *Stenotrophomonas maltophilia* and the effect of citral on cell membrane. *LWT-Food Science and Technology*, 2020; 117:108667.

92. De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Spanu T, Fiori B, *et al.* Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2014; 8:1081-1088.

93. Tabei Y, Ueno K. Phylogenic analysis of bacteria passed through 0.45- μ m-pore-size filters in the rhizosphere. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2010; 56:129–36.

94. Chu WH. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007; 34:241-245.

95. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38:4626-4628.

96. Jonit NQ, Low YC, Tan GH. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* biochemical tests, rice (*Oryza sativa*), bacterial leaf blight (BLB) diseases, Sekinchan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016; 4:63–69.

97. Lányi B. *Járványügyi és Klinikai bakteriológia Módszertani Útmutató*, 1980; p. 441.

98. Kohn J. A preliminary report of a new gelatin liquefaction method. *Journal of Clinical Pathology*, 1953; 6:249.

99. Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT Food Science and Technology*, 2005; 38:565–570.

100. CLSI. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline; CLSI document M26-A; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 1999.

101. Kovács JK, Felső P, Horváth G, Schmidt J, Dorn Á, Ábrahám H, *et al.* Stress response and virulence potential modulating effect of peppermint essential oil in *Campylobacter jejuni*. *BioMed Research International*, 2018; 2019:2971741.
102. Daintith J. Dictionary of Chemistry, 6th ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2008.
103. Anjum A, Liigand J, Milford R, Gautam V, Wishart DS. Accurate prediction of isothermal gas chromatographic Kováts retention indices. *Journal of Chromatography A*, 2023; 1705:464176.
104. Idroes, R.; Japnur, A.F.; Suhendra, R.; Rusyana, A. Kovats Retention Index analysis of flavor and fragrance compound using Biplot Statistical method in gas chromatography systems. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2019, 523, 012007.
105. Shukr MH, Metwally GF. Evaluation of topical gel bases formulated with various essential oils for antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013; 12:877–884.
106. Moore-Neibel K, Gerber C, Patel J, Friedman M, Ravishankar S. Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. *Journal of Applied Microbiology*, 2011; 112:485–492.
107. Berthold Pluta A, Stasiak Róžańska L, Pluta A, Garbowska M. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. *European Food Research and Technology*, 2019; 245:1137–1147.
108. Oulkheir S, Aghrouch M, El Mourabit F, Dalha F, Graich H, Amouch F, *et al.* Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram positive pathogenic bacteria. *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, 2017; 3:1–5.
109. Cui H, Zhang X, Zhou H, Zhao C, Lin L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Botanical Studies*, 2015; 56:16.
110. Shahbazi Y. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. *Journal of Pathogens*, 2015; 2015:916305.
111. Al Zuhairi JJMJ, Kashi FJ, Rahimi-Moghaddam A, Yazdani M. Antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against bacteria isolated from urinary tract infection. *European Journal of Integrative Medicine*, 2020; 38: 101192.
112. Timung R, Barik CR, Purohit S, Goud VV. Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study. *Industrial*

Crops and Products, 2016; 94:178–188.

113. Thosar N, Basak S, Bahadure RN, Rajurkar M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An *in vitro* study. *European Journal of Dentistry*, 2013; 7:71–77.

114. Soetjipto H. Antibacterial properties of essential oil in some Indonesian herbs. In Potential of Essential Oils; El-Shemyn HA, Ed.; *IntechOpen*, Salatiga, Indonesia, 2018; 3:41–58.

115. Damjanovic-Vratnica B, Đakov T, Šukovic D, Damjanovic J. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011; 29:277–284.

116. Messaoudi M, Benregueig M, Merah M, Messaoudi ZA. Antibacterial effects of *Thymus algeriensis* extracts on some pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum-Biological Sciences*, 2019; 41:e48548.

117. Sienkiewicz M, Lysakowska M, Denys P, Kowalczyk E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microbial Drug Resistance*, 2012; 18:137–148.

118. Kacániová M, Galovicová L, Valková V, Tvrďá E, Terentjeva M, Žiarovská J, *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of *Cinnamomum cassia* essential oil and its application in food preservation. *Open Chemistry*, 2021; 19:214–227.

119. Gende LB, Floris I, Fritz R, Eguaras MJ. Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina. *Bulletin of Insectology*, 2008; 61:1–4.

120. Salem AM, Mohamed EF, Selim EM. Antimicrobial effect of some natural oils on *Bacillus cereus* in minced beef. *Benha Veterinary Medical Journal*, 2018; 34:149–156.

121. Calnan CD. Cinnamon dermatitis from an ointment. *Contact dermatitis*, 1976; 2: 167–170.

122. Lee JE, Seo SM, Huh MJ, Lee SC, Park IK. Reactive oxygen species mediated-antifungal activity of cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oils and their constituents against two phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020; 168:104644.

123. Hanaa ARM, Sallam YI, El-Leithy AS, Aly SE. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Annals of Agricultural Sciences*, 2012; 57: 113–116.

124. Al Naqqash ZA, Al-Bazaz HK, Salh FM, Ibraheem SQ. GC-Mass and phytochemical investigation of *Cymbopogon citratus*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2019; 12:67–73.

125. Tisserand R, Young R. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*, 2nd ed.; Churchill Livingstone Elsevier: Edinburgh, UK, 2014.
126. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *MDPI Medicines*, 2016; 3:25.
127. Barra A. Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. *Natural Product Communications*, 2009; 4:1147–1154.
128. Falcao MA, Fianco ALB, Lucas AML, Pereira MAA, Torres FC, Vargas RMF, *et al.* Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. *Phytochemistry Reviews*, 2012; 11:405–412.
129. Schneider G, Schweitzer B, Kovács T. *Bacillus thuringiensis*: A causative agent of pitted keratolysis. *Australasian Journal of Dermatology*, 2021; 62:e609–e611.
130. An M, Haig T, Hatfield P. On-site field sampling and analysis of fragrance from living Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) flowers by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2001; 917: 245–250.
131. Yamanaka K, Zheng W, Crooke E, Wang YH, Inouye M. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2001; 39:1572-1584.
132. Dawan J, Ahn J. Bacterial stress responses as potential targets in overcoming antibiotic resistance. *Microorganisms*, 2022; 10:1385.

9. FEJEZET: Mellékletek

1. melléklet - SPME-GC-MS módszer

Az illóolaj és a kenőcs minták vizsgálata SPME-GC-MS módszerrel történt.

SPME-GC-MS: szilárd fázisú mikroextrakciós mintavétel után gázkromatográfiás és tömegspektrometriás módszer.

10 µl illóolajat vagy 1 ml mintát vizsgáltunk 20 ml-es, szilikon/PTFE szeptummal lezárt headspace (HS) üvegben. A minta statikus gőztéranalízise szilárdfázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME) történt, CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) típusú automata mintavevő alkalmazásával. A minta 5 perces 100°C-on végzett inkubálása után a 65 µm filmvastagságú StableFlex divinilbenzol/carboxen/polidimetilsziloxán (DVB/CAR/PDMS) SPME szálát (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a minta gőzterébe juttattuk, az extrakciót 20 percig végeztük 100°C-on, majd a gázkromatográf injektorába vittük, ahol a deszorpció 250°C-on történt, 1 percig. Az illóolaj esetében az injektálás split módban történt (1:90 split aránnyal), a kenőcsök és a többi folyékony minta esetében splitless módban. Végül a szálát nagy tisztaságú nitrogén gázban 250°C-on 15 percig tisztítottuk és kondicionáltuk.

Az analízist Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) készülékkel, Supelco SLB-5MS kapilláris kolonnán (30 m × 250 µm × 0,25 µm) végeztük. A kolonna hőmérséklete egy 3 perces izoterm szakasz után 60-250 °C-ra emelkedett 8 °C/perc sebességgel, a végső hőmérsékletet 1 percig tartottuk. A vivőgáz nagy tisztaságú, 6,0 hélium, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc (37 cm/s) volt, constant flow módban. A detektálás quadrupole tömegszelektív detektorral elektronionizációs módban (70 eV), teljes scan módban (41–500 amu, 3,2 scan/s) történt. Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) segítségével értékeltük ki. A kvantitatív azonosítás során a komponensek retenciós idejét és tömegspektrumait standardok és a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést területnormalizációval végeztük.

2. melléklet - Az indiai citromfű illóolaj komponensei (SPME-GC-MS)

RRT	Név	m/m%
5,1	α -Pinene	0,36
5,5	Camphene	0,86
6,1	β -Pinene	0,35
6,2	6-Methyl-5-hepten-2-one	0,44
7,2	Limonene	0,20
7,3	Eucaliptol	0,39
8,2	4-Nonaone	0,59
8,8	Linalool	0,68
10,0	Citronellal	28,16
10,1	Isopulegol, iso	2,16
11,5	Citronellol	1,82
11,7	Neral	10,55
11,9	Geraniol	1,99
12,3	Geranial	12,95
13,7	Citronellyl acetate	0,35
14,2	Geranyl acetate	1,46
15,2	β -Caryophyllene	32,86
15,7	α -Humulene	0,28
16,7	γ -Cadinene	0,33
17,8	Caryophyllene oxide	2,92
Σ Total		99,67

3. melléklet

	Cremor			Hydrogel		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%
<i>B. thuringiensis</i> (páciens talpáról)	~5000 db	0 db	0 db	0 db	0 db	0 db
CFU csökkenés mértéke	11,4x	57471x	57471x	57471x	57471x	57471x
<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	2000 db	27 db	21 db	55 db	13 db	0 db
CFU csökkenés mértéke	28,7x	2128,55x	2736,7x	1044,9x	4420,8x	57471x
<i>B. cereus</i>	120 db	0 db	0 db	0 db	0 db	0 db
CFU csökkenés mértéke	478,9x	57471x	57471x	57471x	57471x	57471x
<i>B. cereus</i>	nem hatott	9 db	0 db	150 db	0 db	0 db
CFU csökkenés mértéke	-	6385,6x	57471x	383,14x	57471x	57471x
<i>B. cereus</i>	3000 db	20 db	0 db	2000 db	0 db	0 db
CFU csökkenés mértéke	19,1x	2873,5x	57471x	28,7x	57471x	57471x
<i>B. cereus</i>	2000 db	270 db	170 db	150 db	130 db	86 db
CFU csökkenés mértéke	28,7x	212,8x	338x	383,1x	442x	668,2x
<i>B. cereus</i>	5000 db	70 db	12 db	100 db	30 db	10 db
CFU csökkenés mértéke	11,4x	821x	4789,2x	574,7x	1915,7x	5747,1x
<i>B. cereus</i>	200 db	0 db	0 db	0 db	0 db	0 db
CFU csökkenés mértéke	287,3x	57471x	57471x	57471x	57471x	57471x
<i>B. mycoides</i>	400 db	0 db	0 db	0 db	0 db	0 db
CFU csökkenés mértéke	143,6x	57471x	57471x	57471x	57471x	57471x
<i>B. cereus</i>	5000 db	5000 db	0 db	5 db	0 db	0 db
CFU csökkenés mértéke	11,4x	11,4x	57471x	11494,2x	57471x	57471x
<i>B. cereus</i>	5000 db	280 db	0 db	7 db	3 db	3 db
CFU csökkenés mértéke	11,4x	205,2x	57471x	8210,1x	19157x	19157x

	Lipogel			Vaselinum		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%
<i>B. thuringiensis</i> (páciens talpáról)	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott
CFU csökkenés mértéke	-	-	-	-	-	-
<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	nem hatott	2000 db	2000 db	nem hatott	2000 db	2000 db
CFU csökkenés mértéke	-	28,7x	28,7x	-	28,7x	28,7x
<i>B. cereus</i>	nem hatott	nem hatott	22 db	nem hatott	nem hatott	3000 db
CFU csökkenés mértéke	-	-	2612,3x	-	-	19,1x
<i>B. cereus</i>	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott
CFU csökkenés mértéke	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott
CFU csökkenés mértéke	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	2000 db	1000 db	1000 db	nem hatott	nem hatott	nem hatott
CFU csökkenés mértéke	28,7x	57,4x	57,4x	-	-	-
<i>B. cereus</i>	nem hatott	nem hatott	5000 db	nem hatott	nem hatott	4000 db
CFU csökkenés mértéke	-	-	11,4x	-	-	14,3x
<i>B. cereus</i>	nem hatott	nem hatott	600 db	nem hatott	nem hatott	nem hatott
CFU csökkenés mértéke	-	-	95,7x	-	-	-
<i>B. mycoides</i>	5000 db	5000 db	5000 db	5000 db	5000 db	5000 db
CFU csökkenés mértéke	11,4x	11,4x	11,4x	11,4x	11,4x	11,4x
<i>B. cereus</i>	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	5000 db
CFU csökkenés mértéke	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	nem hatott	560 db
CFU csökkenés mértéke	-	-	-	-	-	102,6x

4. melléklet-Génexpressziós változások (indiai citromfű kontroll mintához hasonlítva)

7perc IC és K

FC	GeneName	Product	ProteinID
-64,81731825	gerPD	spore germination protein GerPD	WP_001052807. 1
-58,43558643		hypothetical protein	WP_001141264. 1
-39,29039095		YozD family protein	WP_000658451. 1
-32,90865913		anti sigma factor C-terminal domain-containing protein"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
-26,5269273		hypothetical protein	WP_000440540. 1
-13,2612554	alo	anthrolysin O/cereolysin O family cholesterol-dependent cytolysin Alo	WP_000576726. 1
-7,63141233		hypothetical protein	WP_000875292. 1
-6,803778332	plcA	phosphatidylinositol diacylglycerol-lyase	WP_000066296. 1
-5,767116692	cytK2	beta-channel forming cytolysin CytK2	WP_000830633. 1
-5,686200957		LytR family transcriptional regulator	WP_000727049. 1
-5,684668634	malD	maltosaccharide ABC transporter permease MalD	WP_001022603. 1
-5,607913689	narK	nitrate transporter NarK	WP_000841859. 1
-5,472596799	moaD	molybdopterin converting factor subunit 1	WP_000573676. 1
-5,288320976		molybdopterin-synthase adenyltransferase MoeB	WP_001158064. 1
-5,041854497	guaC	GMP reductase	WP_000432435.

			1
-4,982663162	nheA	non-hemolytic enterotoxin NHE subunit A	WP_000751827. 1
-4,742985444		HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	WP_001071419. 1
-4,713640571		acyl-CoA desaturase	WP_000661208. 1
-4,700198193		molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaE	WP_000149965. 1
-4,695794923		hypothetical protein"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
-4,651461167			
-4,554163769		LuxR C-terminal-related transcriptional regulator	WP_000827555. 1
-4,442605958		peptidase	WP_000689202. 1
-4,348889364	moaA	GTP 3',8-cyclase MoaA	WP_000545008. 1
-4,291693202		PTS lactose/cellobiose transporter subunit IIA	WP_000774624. 1
-4,261084255		M4 family metallopeptidase	WP_001109527. 1
-4,130684336		molybdopterin molybdotransferase MoeA	WP_000890784. 1
-4,000159765		MupG family TIM beta-alpha barrel fold protein	WP_000440050. 1
-3,998232737		DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit	WP_000095296. 1
-3,878764478	malC	maltosaccharide ABC transporter permease MalC	WP_001194982. 1
-3,828233072	nheC	non-hemolytic enterotoxin NHE subunit C	WP_001171991. 1
-3,82228176	narH	nitrate reductase subunit beta	WP_000692712.

			1
-3,733551336	narI	respiratory nitrate reductase subunit gamma	WP_000981851.1
-3,697166689		S-layer homology domain-containing protein	WP_000288185.1
-3,669779696	treP	PTS system trehalose-specific EIIBC component	WP_000513958.1
-3,656477907		type II CAAX endopeptidase family protein	WP_001232991.1
-3,647441818		PH domain-containing protein	WP_001068221.1
-3,610844003	narJ	nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone	WP_015055116.1
-3,499441377		nitrate reductase subunit alpha	WP_000730788.1
-3,440266872	treC	alpha,alpha-phosphotrehalase	WP_000656153.1
-3,415693548	nheB	non-hemolytic enterotoxin NHE subunit B	WP_000162967.1
-3,399732704		YeiH family protein	WP_000438436.1
-3,358736031		extracellular solute-binding protein	WP_000709931.1
-3,319798359		endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	WP_000771975.1
-3,271532771		hypothetical protein	WP_000773518.1
-3,115348597		acyltransferase	WP_000194335.1
-3,109334184			
-2,996487315	rbsA	ribose ABC transporter ATP-binding protein RbsA	WP_000546782.1
-2,987124078	cydA	cytochrome ubiquinol oxidase subunit	WP_001286168.

		I	1
2,982321851		peptide ABC transporter substrate-binding protein	WP_000731059.1
3,016037274		LLM class flavin-dependent oxidoreductase	WP_000594040.1
3,02110404		acyl-CoA dehydrogenase family protein	WP_000416293.1
3,037489364		ABC transporter permease	WP_000176133.1
3,046224421	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	WP_001007616.1
3,079457531		hypothetical protein	WP_000108701.1
3,081045865		ABC transporter permease	WP_000265452.1
3,084170835		efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	WP_000728804.1
3,091951409		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_000074955.1
3,099935036	tatC	twin-arginine translocase subunit TatC	WP_000390119.1
3,166666135	phaC	class III poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase subunit PhaC	WP_000206336.1
3,170061638		NADPH-dependent FMN reductase	WP_000780357.1
3,18334136		ATP-binding cassette domain-containing protein	WP_001196381.1
3,19496814		SdpI family protein	WP_000716359.1
3,232280436		YhzD family protein	WP_000539550.1
3,23273834		RNA polymerase sigma factor	WP_071730900.1

3,268722795		autorepressor SdpR family transcription factor	WP_001070531.1
3,294380221		DoxX family protein	WP_024927972.1
3,295413843	namA	NADPH dehydrogenase NamA	WP_001086179.1
3,30392126		DUF456 domain-containing protein	WP_000217340.1
3,322153593		hypothetical protein	WP_000584358.1
3,333002228		acetyl-CoA C-acetyltransferase	WP_001206331.1
3,352127655		amidohydrolase family protein	WP_000219590.1
3,390484087		GNAT family protein	WP_000494680.1
3,397707649		DUF4870 domain-containing protein	WP_000678057.1
3,417388091		DUF3238 domain-containing protein	WP_000182102.1
3,422916434		tyrosine-type recombinase/integrase	WP_000806236.1
3,425105284		Nif3-like dinuclear metal center hexameric protein	WP_001022444.1
3,439906415	lrgA	antiholin-like murein hydrolase modulator LrgA	WP_000104901.1
3,537733164		class I SAM-dependent methyltransferase	WP_003270732.1
3,542719365	lrgB	antiholin-like protein LrgB	WP_000168866.1
3,554603577		hemolysin family protein	WP_000402259.1
3,558969227		GNAT family N-acetyltransferase	WP_001003161.1

3,569816267		ABC transporter permease	WP_000880730. 1
3,592207029		enoyl-CoA hydratase	WP_003269647. 1
3,60802934		SdpI family protein"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
3,651931805		DUF3948 family protein	WP_001060007. 1
3,67164072		MerR family transcriptional regulator	WP_000285639. 1
3,67276827		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000798236. 1
3,684520451	clpB	ATP-dependent chaperone ClpB	WP_000365411. 1
3,721314123		NDxxF motif lipoprotein	WP_000760975. 1
3,745763458		DUF3948 family protein	WP_001060018. 1
3,748909217		ATP-binding cassette domain-containing protein	WP_000166350. 1
3,755619491		YlaH-like family protein	WP_000893662. 1
3,777299699	pcp	pyroglutamyl-peptidase I	WP_000859711. 1
3,791364684		magnesium transporter CorA family protein	WP_000388919. 1
3,813612124		helix-turn-helix transcriptional regulator	WP_001259911. 1
4,019841223		hypothetical protein	WP_000415617. 1
4,132547271		monooxygenase	WP_000323765. 1
4,243760551	clpC	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpC	WP_000971170. 1

4,251218939	ATP synthase subunit I	WP_000613874. 1
4,26553882	DUF3888 domain-containing protein	WP_000702350. 1
4,3127201	DUF1700 domain-containing protein	WP_001042975. 1
4,433844906	ArsI/CadI family heavy metal resistance metalloenzyme	WP_001271003. 1
4,433844906	DUF4260 domain-containing protein	WP_001172063. 1
4,438849037	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase family protein	WP_000486359. 1
4,680245724	ABC transporter permease	WP_001097716. 1
4,814965534	TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_003291871. 1
4,858848256	peptide MFS transporter	WP_000446273. 1
4,860186511	BA3454 family stress response protein	WP_000573532. 1
4,954707489	cation:proton antiporter	WP_000393901. 1
5,01145858	hypothetical protein	WP_001253201. 1
5,028157031	protein arginine kinase	WP_000050836. 1
5,13989795	Rrf2 family transcriptional regulator	WP_000704073. 1
5,146889073	DUF3238 domain-containing protein	WP_000247262. 1
5,235244468	DUF3902 family protein	WP_000843829. 1

5,28460159		heme-degrading domain-containing protein	WP_105559683.1
5,312780257	opuD	glycine betaine transporter OpuD	WP_000591569.1
5,496874343		PspA/IM30 family protein	WP_000814127.1
5,580479111		MFS transporter	WP_001186932.1
5,732491635		aspartate kinase	WP_000448069.1
5,736269622		UvrB/UvrC motif-containing protein	WP_000128385.1
5,885971976	opuD	glycine betaine transporter OpuD	WP_001229103.1
5,960095747		trypsin-like peptidase domain-containing protein	WP_000542643.1
6,069329977	prsA	peptidylprolyl isomerase PrsA	WP_001214221.1
6,328305136		ABC transporter permease subunit	WP_001041425.1
6,549735939	ctsR	transcriptional regulator CtsR	WP_001244560.1
6,645643396		MFS transporter	WP_000502472.1
6,826298349		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000626565.1
6,904266855	saiR	Rrf2-family transcriptional regulator SaiR	WP_001083465.1
7,082475205	spxA	transcriptional regulator SpxA	WP_000236188.1
7,296443518		efflux RND transporter permease subunit	WP_001033497.1
7,389842632		hypothetical protein	WP_000991350.1

7,804445398	PadR family transcriptional regulator	WP_001102628. 1
7,814258	hypothetical protein	WP_000808640. 1
7,936803485	hypothetical protein	WP_000945243. 1
8,22877198	type 1 glutamine amidotransferase domain-containing protein	WP_000037549. 1
8,251412067	hypothetical protein	WP_000050944. 1
8,449787664	hypothetical protein	WP_000391019. 1
9,006539841	FbpB family small basic protein	WP_001228048. 1
9,162873529	hypothetical protein	WP_000979048. 1
9,162873529	DedA family protein	WP_000418942. 1
9,22022306	IDEAL domain-containing protein	WP_000987464. 1
9,303272001	DUF4097 family beta strand repeat-containing protein	WP_000976233. 1
9,436648953	general stress protein	WP_000557321. 1
9,607245558	peptidylprolyl isomerase	WP_000727352. 1
9,626615464	DUF1700 domain-containing protein	WP_000031386. 1
9,739834598	M15 family metallopeptidase	WP_001237442. 1
10,18772519	general stress protein	WP_001100088. 1
10,35524094	ParM/StbA family protein	WP_000839425. 1

11,2199138		catalase	WP_001035761. 1
11,84839576		HXXEE domain-containing protein"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
12,03611969	rsbW	anti-sigma B factor RsbW	WP_003269702. 1
12,53164134		hypothetical protein	WP_000683219. 1
12,62932732	rsbV	anti sigma b factor antagonist RsbV	WP_002106052. 1
14,07487708		amino acid permease	WP_001083396. 1
14,61858558	sigB	RNA polymerase sigma factor SigB	WP_015055091. 1
14,90212806		ferritin-like domain-containing protein	WP_000017752. 1
15,73822384		DUF4028 family protein	WP_003269707. 1
21,23115371		general stress protein	WP_000448820. 1
25,47757935		CsbD family protein	WP_000004263. 1
26,31378208		DUF1304 domain-containing protein	WP_000402492. 1
27,73724673		MarR family transcriptional regulator	WP_000942494. 1
35,52357443		GlsB/YeaQ/YmgE family stress response membrane protein	WP_000522903. 1
66,80497327		nitroreductase family protein	WP_000185375. 1
79,6805404		MarR family transcriptional regulator	WP_000204172. 1
83,58482034		putative quinol monooxygenase	WP_000583843. 1

90,52764569	ArsA family ATPase	WP_002182396. 1
1958,487582	DUF3926 domain-containing protein	WP_000544108. 1

FC	GeneName	Product	ProteinID
-70,515767 5	arcA	arginine deiminase	WP_000682331. 1
-68,396543 4		DUF2075 domain-containing protein	WP_000947885. 1
-61,872123 8	argF	ornithine carbamoyltransferase	WP_000930283. 1
-61,756224 5	arcC	carbamate kinase	WP_000113953. 1
-52,913617 9		amino acid ABC transporter permease	WP_001046915. 1
-48,957709 3		hemolysin III family protein	WP_000995368. 1
-43,144862 5	arcD	arginine-ornithine antiporter	WP_000503414. 1
-39,512310 5		ABC transporter permease	WP_000059443. 1
-39,512310 5			
-29,884232 9		hypothetical protein	WP_000931770. 1
-29,560736 5		transporter substrate-binding domain-containing protein	WP_000737678. 1
-24,453530 5		amino acid ABC transporter ATP-binding protein	WP_000590203. 1
-16,810685	cytK2	beta-channel forming cytolysin CytK2	WP_000830633. 1
-14,232506 3		YeiH family protein	WP_000438436. 1
-13,287715 2		cell wall-binding protein EntA	WP_000733344. 1
-13,002834 7	nheA	non-hemolytic enterotoxin NHE subunit A	WP_000751827. 1

-12,491050 6		ABC transporter permease	WP_000477752. 1
-11,736794 1	narK	nitrate transporter NarK	WP_000841859. 1
-11,697438 2	nheB	non-hemolytic enterotoxin NHE subunit B	WP_000162967. 1
-10,701011 2	moaD	molybdopterin converting factor subunit 1	WP_000573676. 1
-10,581367 2		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000202605. 1
-10,570892 5		PTS lactose/cellobiose transporter subunit IIA	WP_000774624. 1
-10,334248 5		LuxR C-terminal-related transcriptional regulator	WP_000827555. 1
-10,131818		hypothetical protein	WP_000184928. 1
-10,002003 1		DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit	WP_000095296. 1
-9,9659169 2		precorrin-2 dehydrogenase	WP_000282601. 1
-9,7933951 9	cydA	cytochrome ubiquinol oxidase subunit I	WP_001286168. 1
-9,4150912		NCS2 family permease	WP_000676248. 1
-9,2616339 3	argH	argininosuccinate lyase	WP_000041256. 1
-9,1437987 5		acyltransferase	WP_000194335. 1
-9,1234042 1	nheC	non-hemolytic enterotoxin NHE subunit C	WP_001171991. 1
-9,1015986 3		HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	WP_001071419. 1
-8,7627077 3	nirD	nitrite reductase small subunit NirD	WP_000616683. 1

-8,6169330 2	cydB	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	WP_000017662. 1
-8,5981942 3	alo	anthrolysin O/cereolysin O family cholesterol-dependent cytolysin Alo	WP_000576726. 1
-8,5407547 3		quorum-sensing peptide PapR	WP_000734725. 1
-7,9191930 6	plcA	phosphatidylinositol diacylglycerol-lyase	WP_000066296. 1
-7,9173388 3	colA	collagenase ColA	WP_001036420. 1
-7,8135724 5	argG	argininosuccinate synthase	WP_000412336. 1
-7,5154841 9		cation:dicarboxylase symporter family transporter	WP_000713287. 1
-7,4009385 8		nucleoside transporter C-terminal domain-containing protein	WP_000706853. 1
-7,3868815 6		L-lactate dehydrogenase	WP_003292187. 1
-7,3179972 7	brnQ	branched-chain amino acid transport system II carrier protein	WP_001260915. 1
-7,228768		PH domain-containing protein	WP_000669072. 1
-7,1394753 1		DUF1836 domain-containing protein	WP_000427877. 1
-7,0950772 5		M4 family metallopeptidase	WP_001109527. 1
-7,0011634 5	cerA	phospholipase CerA	WP_000730997. 1
-6,9007376 5	narI	respiratory nitrate reductase subunit gamma	WP_000981851. 1
-6,8572801 1		molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaE	WP_000149965. 1
-6,7036276 5		peptidase	WP_000689202. 1

-6,6955784		formate/nitrite transporter family protein	WP_000893034. 1
-6,6871057	nirB	NADPH-nitrite reductase large subunit	WP_000746957. 1
-6,6870978	malC	maltosaccharide ABC transporter permease MalC	WP_001194982. 1
-6,4415992		LPXTG cell wall anchor domain-containing protein	WP_033795766. 1
-6,4327377		PTS sugar transporter subunit IIC"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
-6,4275336		PTS sugar transporter subunit IIB	WP_000275645. 1
-6,3901579		molybdopterin molybdotransferase MoeA	WP_000890784. 1
-6,3811345	modA	molybdate ABC transporter substrate-binding protein	WP_001032240. 1
-6,3251306		hypothetical protein	WP_000773518. 1
-6,3164013		type II CAAX endopeptidase family protein	WP_001232991. 1
-6,2858369		DoxX family protein	WP_000586151. 1
-6,2617030		N-acetyltransferase	WP_000686656. 1
-6,2518579		acyl-CoA desaturase	WP_000661208. 1
-6,1596313		sirohydrochlorin chelatase	WP_000676477. 1
-5,9773518	sph	sphingomyelinase C	WP_000676798. 1
-5,9335921		pyruvate formate lyase family protein	WP_033795763. 1
-5,9055737	ftsE	cell division ATP-binding protein FtsE	WP_000594326. 1

-5,9016525	brnQ	branched-chain amino acid transport system II carrier protein	WP_000842650. 1
-5,8908810 1	rbsA	ribose ABC transporter ATP-binding protein RbsA	WP_000546782. 1
-5,8889826 7		YrzI family small protein	WP_000142729. 1
-5,8447495 3	ftsX	permease-like cell division protein FtsX	WP_000645028. 1
-5,8003387 2		spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding protein	WP_102981848. 1
-5,7482870 1		Crp/Fnr family transcriptional regulator	WP_001081906. 1
-5,7431956 1		DUF6123 family protein	WP_001195212. 1
-5,6878550 5		uroporphyrin-III C-methyltransferase	WP_001014975. 1
-5,6226071 2		cytochrome c biogenesis protein CcdC	WP_000561070. 1
-5,4638757 2	rbsD	D-ribose pyranase	WP_000716151. 1
-5,3699229 6		extracellular solute-binding protein	WP_000709931. 1
-5,3246090 6	narH	nitrate reductase subunit beta	WP_000692712. 1
-5,3089646 5		molybdopterin-synthase adenylyltransferase MoeB	WP_001158064. 1
-5,2387061 1		pyruvate formate lyase family protein	WP_033795764. 1
-5,1892576 9	narJ	nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone	WP_015055116. 1
-5,1762695 1		AtpZ/AtpI family protein	WP_001171223. 1
-5,0873329 9		hypothetical protein	WP_000473371. 1

-5,0686232 2	pflA	pyruvate formate-lyase-activating protein	WP_000238463. 1
-5,0521022 1		sporulation protein	WP_000486630. 1
-5,0179828 3			
-4,9722237 8		5'-nucleotidase, lipoprotein e(P4) family	WP_000782772. 1
-4,9579574 8	modB	molybdate ABC transporter permease subunit	WP_000020518. 1
-4,8685215 5		Ig-like domain-containing protein	WP_000732738. 1
-4,8216723 4	atpB	F0F1 ATP synthase subunit A	WP_000399870. 1
-4,7216878 9		TIGR01457 family HAD-type hydrolase	WP_000276470. 1
-4,7145224 2	entC	cell wall-binding protein EntC	WP_000421977. 1
-4,6863049 6	malD	maltosaccharide ABC transporter permease MalD	WP_001022603. 1
-4,6640111		stage VI sporulation protein F	WP_000369753. 1
-4,6300356 4		hypothetical protein	WP_000221434. 1
-4,5373651 6	uppP	bacitracin resistance undecaprenyl-diphosphatase	WP_000796252. 1
-4,5159969 1	malL	oligo-1,6-glucosidase	WP_000415171. 1
-4,4899247 2		SpaA isopeptide-forming pilin-related protein	WP_033795765. 1
-4,4772238 4	moaA	GTP 3',8-cyclase MoaA	WP_000545008. 1
-4,4172468 6		DUF2179 domain-containing protein	WP_000938438. 1

-4,4099980 9		anaerobic C4-dicarboxylate transporter	WP_000498704. 1
-4,3721761 1	yfkAB	radical SAM/CxCxxxxC motif protein YfkAB	WP_000156020. 1
-4,3669745 9		aromatic amino acid transport family protein	WP_001014163. 1
-4,3239354 6	atpA	F0F1 ATP synthase subunit alpha	WP_000027521. 1
-4,3225136 5		basic amino acid/polyamine antiporter	WP_000129441. 1
-4,2811057 2		DUF3937 domain-containing protein	WP_002082716. 1
-4,2760147 2		ABC transporter permease	WP_001085254. 1
-4,2498992 6		DMT family transporter	WP_000192813. 1
-4,2198627		PH domain-containing protein	WP_001068221. 1
-4,2091991 8		sulfite exporter TauE/SafE family protein	WP_000455762. 1
-4,1896386 3		NCS2 family permease	WP_000482716. 1
-4,1561006 2	rbsC	ribose ABC transporter permease	WP_001074649. 1
-4,1457179 1		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000631619. 1
-4,1423390 2		transglutaminase domain-containing protein	WP_000520861. 1
-4,1378073 7		hypothetical protein	WP_000847514. 1
-4,1080205		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	WP_001080878. 1
-4,1063765 9	aspA	aspartate ammonia-lyase	WP_000224199. 1

-4,0819218 7	atpE	F0F1 ATP synthase subunit C	WP_000052064. 1
-4,0667146 2	atpG	F0F1 ATP synthase subunit gamma	WP_000157703. 1
-4,0636185 5		SulP family inorganic anion transporter	WP_000486667. 1
-4,0630536 5		5'-nucleotidase C-terminal domain-containing protein	WP_000913775. 1
-4,0565964 9		DMT family transporter	WP_000965811. 1
-4,0565964 9		hypothetical protein	WP_000814431. 1
-4,0418406 4		lactate permease LctP family transporter	WP_000109099. 1
-4,0310584 1		phosphatase PAP2 family protein	WP_000833369. 1
-4,0268563 8	rbsK	ribokinase	WP_001132859. 1
-4,0261007 9		VaFE repeat-containing surface-anchored protein	WP_000520161. 1
-4,0098354 3		methyl-accepting chemotaxis protein	WP_000878450. 1
-4,0041871 9	rplJ	50S ribosomal protein L10	WP_000048718. 1
-4,0014356 7		heavy metal translocating P-type ATPase	WP_001083749. 1
-3,9953100 3		acetylornithine transaminase	WP_000200543. 1
-3,986705		SpaA isopeptide-forming pilin-related protein	WP_080546714. 1
-3,9425560 8	tkt	transketolase	WP_000019776. 1
-3,9235601 4	nhaC	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaC	WP_000843992. 1

-3,9125149 6		DUF6080 domain-containing protein	WP_001028674. 1
-3,9010727 5			
-3,8868289		DUF3913 family protein	WP_000707107. 1
-3,8485603 5		polysaccharide deacetylase family protein	WP_000409484. 1
-3,8476191		undecaprenyl-diphosphate phosphatase	WP_000434792. 1
-3,8400881 8		SGNH/GDSL hydrolase family protein	WP_001034211. 1
-3,8298617 4		hypothetical protein	WP_000608227. 1
-3,8241811	adhE	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	WP_000260464. 1
-3,8201823 2	argJ	bifunctional glutamate N-acetyltransferase/amino-acid acetyltransferase ArgJ	WP_000598387. 1
-3,7949885 4		ATP synthase subunit I	WP_000567600. 1
-3,7879829 1		RDD family protein	WP_000769080. 1
-3,7704377 5		flagellar biosynthetic protein FliQ	WP_001098080. 1
-3,7512546	lldP	L-lactate permease	WP_001099343. 1
-3,7369755 7		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000411132. 1
-3,7301879 8		3D domain-containing protein	WP_001105779. 1
-3,7178202 5		tyrosine protein phosphatase	WP_000566188. 1
-3,7115820		DMT family transporter	WP_000806936.

9			1
-3,7074841	adhP	alcohol dehydrogenase AdhP	WP_000649129.
8			1
-3,6900306		protein kinase	WP_000872060.
5			1
-3,6886820	atpH	F0F1 ATP synthase subunit delta	WP_000064682.
9			1
-3,6886248		MupG family TIM beta-alpha barrel fold protein	WP_000440050.
9			1
-3,6857746	murD	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine--D-glutamate ligase	WP_000860102.
6			1
-3,6516787		M23 family metallopeptidase	WP_000726083.
1			1
-3,6434496		DUF2101 family protein	WP_001004552.
			1
-3,6382193	mraY	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	WP_000893060.
1			1
-3,6371276		aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme	WP_000523043.
			1
-3,6152633	atpD	F0F1 ATP synthase subunit beta	WP_001032596.
6			1
-3,5951889		EamA family transporter	WP_001089870.
7			1
-3,5934542	proB	glutamate 5-kinase	WP_000744741.
3			1
-3,5880572		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	WP_000875330.
1			1
-3,5516972		PTS transporter subunit IIBC	WP_000705566.
4			1
-3,5506155		cation-translocating P-type ATPase	WP_000073697.
3			1
-3,5055415		nitrate reductase subunit alpha	WP_000730788.
6			1

-3,5040741 5	atpF	F0F1 ATP synthase subunit B	WP_001142615. 1
-3,4969031 4		MarR family transcriptional regulator	WP_000081434. 1
-3,4886807 8		S-layer homology domain-containing protein	WP_000288185. 1
-3,4816403 3		hypothetical protein	WP_000754327. 1
-3,4777484 6		glycerophosphodiester phosphodiesterase	WP_001226356. 1
-3,4702833 8	argC	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	WP_000861238. 1
-3,4655625 1		VOC family protein	WP_000800670. 1
-3,4090598 6		C40 family peptidase	WP_000499486. 1
-3,4077164 1		PTS sugar transporter subunit IIC	WP_001013042. 1
-3,3954782	murA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	WP_000413248. 1
-3,3917819 6		HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	WP_000937311. 1
-3,3868172 4		1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	WP_000241788. 1
-3,3781953		ABC transporter substrate-binding protein	WP_001225642. 1
-3,3732310 9	ugpC	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC	WP_000818934. 1
-3,3645998 9	galE	UDP-glucose 4-epimerase GalE	WP_001084634. 1
-3,3597773 7		VOC family protein	WP_000610162. 1
-3,3336143 2		M4 family metallopeptidase	WP_003270706. 1

-3,3303843 5	ric	iron-sulfur cluster repair di-iron protein	WP_000679632. 1
-3,3282627 7	rplS	50S ribosomal protein L19	WP_001186516. 1
-3,3276406 1		ABC transporter permease	WP_000054363. 1
-3,3215858 8	dltD	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD	WP_001030272. 1
-3,3104818 5		SpaA isopeptide-forming pilin-related protein	WP_050426835. 1
-3,3037022 2	murQ	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	WP_000892367. 1
-3,3023567 8		polysaccharide biosynthesis protein	WP_001284026. 1
-3,2957018 4		endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	WP_000771975. 1
-3,2866192 8		pseudouridine synthase	WP_001234948. 1
-3,2852552 6		inorganic phosphate transporter	WP_000380276. 1
-3,2839171 4	nrdG	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	WP_000867078. 1
-3,2682668 6	murE	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	WP_000766290. 1
-3,2667430 6			
-3,2664715 4	guaC	GMP reductase	WP_000432435. 1
-3,2644006 1		lytic polysaccharide monooxygenase	WP_001065156. 1
-3,2591527 5		DUF1349 domain-containing protein	WP_001027673. 1
-3,2530170 6		DUF368 domain-containing protein	WP_000455196. 1

-3,2210038 9		hypothetical protein	WP_000929276. 1
-3,2192259 1		F0F1 ATP synthase subunit alpha	WP_000525484. 1
-3,2120013 9		DUF3919 family protein	WP_000826624. 1
-3,2006063 1	csaB	polysaccharide pyruvyl transferase CsaB	WP_001241597. 1
-3,1961272 1	treP	PTS system trehalose-specific EIIBC component	WP_000513958. 1
-3,1844004 2	hblC	hemolytic enterotoxin HBL lytic component L2	WP_000850154. 1
-3,1777997 9	sirA	sporulation inhibitor of replication protein SirA	WP_000860652. 1
-3,1734073 4	amyS	alpha-amylase	WP_000476397. 1
-3,1632747 5		response regulator transcription factor	WP_000699555. 1
-3,1573381 6		L-cystine transporter	WP_001094344. 1
-3,1506785 1		flagellar type III secretion system protein FlhB	WP_001040120. 1
-3,1485010 1	entD	cell wall-binding protein EntD	WP_000735452. 1
-3,1428569 9		NUDIX hydrolase	WP_000540529. 1
-3,1336431 6		endonuclease	WP_000672184. 1
-3,1306575 7		class I SAM-dependent methyltransferase	WP_000764492. 1
-3,1200799 6		GNAT family N-acetyltransferase	WP_000632238. 1
-3,1127757 9	ctaA	heme A synthase	WP_001188740. 1

-3,11158372	atpC	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	WP_000847215. 1
-3,0536655 6		GRP family sugar transporter	WP_000353544. 1
-3,0484197 8	upp	uracil phosphoribosyltransferase	WP_000517539. 1
-3,0353346 5		CpsD/CapB family tyrosine-protein kinase	WP_001207174. 1
-3,0329396 1		peptide ABC transporter substrate-binding protein	WP_000823498. 1
-3,0308451 3		MFS transporter	WP_014482022. 1
3,01376376		LacI family DNA-binding transcriptional regulator	WP_001273986. 1
3,02541535		response regulator transcription factor	WP_000238956. 1
3,0383517		metallophosphoesterase family protein	WP_000821977. 1
3,06446231		multidrug efflux SMR transporter	WP_000312623. 1
3,08020283	hmoB	heme-degrading monooxygenase HmoB	WP_000644097. 1
3,08157854		hypothetical protein	WP_000965149. 1
3,08359976		helix-turn-helix transcriptional regulator	WP_000433731. 1
3,09507507		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_000710981. 1
3,10003394	cdr	CoA-disulfide reductase	WP_000087589. 1
3,11522301	trxB	thioredoxin-disulfide reductase	WP_001288078. 1
3,1225119		NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	WP_001078267. 1

3,14655305		O-methyltransferase	WP_000014165. 1
3,15210438		hypothetical protein	WP_000582785. 1
3,15592863		hotdog fold thioesterase	WP_001140612. 1
3,16242002		stage V sporulation protein S	WP_000427801. 1
3,1624329		fatty acid--CoA ligase family protein	WP_001055187. 1
3,16396198		ABC transporter permease/substrate-binding protein	WP_000181020. 1
3,17964244		YqkE family protein	WP_000727561. 1
3,18301401		hypothetical protein	WP_000651909. 1
3,18350994	panE	2-dehydropantoate 2-reductase	WP_001221908. 1
3,19265078		MaoC/PaaZ C-terminal domain-containing protein	WP_000111564. 1
3,19414555	lrgB	antiholin-like protein LrgB	WP_000168866. 1
3,20090061		helix-turn-helix domain-containing protein	WP_000760481. 1
3,20827795		bifunctional cystathionine gamma-lyase/homocysteine desulfhydrase	WP_001201921. 1
3,21146809		DUF3910 family protein	WP_001102539. 1
3,22031149		WXG100 family type VII secretion target"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
3,22613517		metallophosphoesterase	WP_000793730. 1
3,22863132	acsA	acetate--CoA ligase	WP_000862058. 1

3,22904278		DUF4822 domain-containing protein	WP_001034144. 1
3,22908299		XRE family transcriptional regulator	WP_000581028. 1
3,24015975	kdpC	K(+)-transporting ATPase subunit C	WP_000412606. 1
3,24840533		hypothetical protein	WP_000756044. 1
3,25147354	metQ	methionine ABC transporter substrate-binding lipoprotein MetQ	WP_000722397. 1
3,25729548		HesB/YadR/YfhF family protein	WP_001054453. 1
3,26260193	phaR	polyhydroxyalkanoic acid synthase subunit PhaR	WP_000566941. 1
3,26723458		MBL fold metallo-hydrolase	WP_001037064. 1
3,2676461		iron ABC transporter permease	WP_000902728. 1
3,26895141		hypothetical protein"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
3,26917723		YbdD/YjiX family protein	WP_000914501. 1
3,29861181		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_002005730. 1
3,30593538		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_001223565. 1
3,31933975		N-acetyltransferase	WP_001033858. 1
3,32744243		carboxylic ester hydrolase	WP_001012288. 1
3,32853639		MarR family transcriptional regulator	WP_000845467. 1
3,33966236		MFS transporter	WP_000793346. 1

3,34660629	hlyII	hemolysin II HlyII	WP_000709369. 1
3,34917991		arylamine N-acetyltransferase	WP_000129189. 1
3,35558277		FbpB family small basic protein	WP_001228048. 1
3,36080489		YuiB family protein	WP_000027016. 1
3,37694134		hypothetical protein	WP_000583951. 1
3,38640216	phaP	polyhydroxyalkanoic acid inclusion protein PhaP	WP_000448592. 1
3,38707239		hypothetical protein	WP_000959124. 1
3,39537447		response regulator	WP_000921571. 1
3,40603426		SGNH/GDSL hydrolase family protein	WP_015055217. 1
3,40850552		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000207730. 1
3,41372488	etfB	electron transfer flavoprotein subunit beta	WP_001029028. 1
3,41505555		acetamidase/formamidase family protein	WP_000285662. 1
3,42097034		ATP-binding cassette domain-containing protein	WP_000166350. 1
3,44008331	gapN	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	WP_000213616. 1
3,46720633		pirin family protein	WP_000488929. 1
3,48476512		alpha/beta fold hydrolase	WP_000614109. 1
3,48778337		iron-containing alcohol dehydrogenase	WP_001179067. 1

3,49515863	spoVG	septation regulator SpoVG	WP_000454041. 1
3,49637739		YugN family protein	WP_001160949. 1
3,5062433	glgC	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	WP_000057604. 1
3,51204358		peptide MFS transporter	WP_000446273. 1
3,51730423		ClpXP adapter SpxH family protein	WP_000360658. 1
3,53606978		MBL fold metallo-hydrolase	WP_003271122. 1
3,55313832		hypothetical protein	WP_001258141. 1
3,55545454	grpE	nucleotide exchange factor GrpE	WP_000392711. 1
3,55974467		hypothetical protein	WP_000516816. 1
3,56082821		DUF5065 family protein	WP_000732060. 1
3,56258555		VOC family protein	WP_000009849. 1
3,56598285		MFS transporter	WP_001149399. 1
3,58408553		DUF3975 family protein	WP_000265371. 1
3,5855995	gnd	decarboxylating 6-phosphogluconate dehydrogenase	WP_001195916. 1
3,594406		DUF2441 domain-containing protein	WP_001001050. 1
3,60212305	isdE	heme ABC transporter substrate-binding protein IsdE	WP_001264109. 1
3,60899197	icd	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	WP_000206893. 1

3,62399034		hemolysin family protein	WP_000353735. 1
3,64167415		fused response regulator/phosphatase	WP_000025512. 1
3,66367154		DUF3267 domain-containing protein	WP_003270612. 1
3,67898522		GNAT family N-acetyltransferase	WP_000706912. 1
3,67978791		ABC transporter permease subunit	WP_001206475. 1
3,69981541		DsbA family oxidoreductase	WP_000216673. 1
3,71292303		NAD(P)H-dependent oxidoreductase	WP_000683412. 1
3,72377098		aldo/keto reductase	WP_000877945. 1
3,72628926	hppD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	WP_000810920. 1
3,73102271		LacI family DNA-binding transcriptional regulator	WP_000201347. 1
3,73204567	proI	pyrroline-5-carboxylate reductase ProI	WP_000027242. 1
3,77125237		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000944629. 1
3,77323219		sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	WP_003274080. 1
3,77883056		YkuS family protein	WP_000101021. 1
3,7819204		acyl-CoA thioesterase	WP_000141164. 1
3,80158029		DUF3948 family protein	WP_001083691. 1
3,83252956		heme-degrading domain-containing protein	WP_105559683. 1

3,83260492	dnaK	chaperone protein DnaK	WP_000034701. 1
3,84387259		DUF969 domain-containing protein	WP_000593392. 1
3,84672266		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_000074955. 1
3,85115016		MaoC family dehydratase	WP_001067916. 1
3,88083119		DUF456 domain-containing protein	WP_000217340. 1
3,8828193	fsa	fructose-6-phosphate aldolase	WP_000667692. 1
3,88781834	metQ	methionine ABC transporter substrate-binding lipoprotein MetQ	WP_000735081. 1
3,90140221		heme oxygenase	WP_000587824. 1
3,92529726		WYL domain-containing protein	WP_003271203. 1
3,94042919		uracil-DNA glycosylase	WP_000432540. 1
3,95771229		YgzB family protein	WP_000025058. 1
3,96265672		twin-arginine translocase TatA/TatE family subunit	WP_000492442. 1
3,98271284		nitroreductase family protein	WP_001277032. 1
4,01200352		GNAT family N-acetyltransferase	WP_000615371. 1
4,01332165		DUF1885 family protein	WP_001163300. 1
4,01365865		hypothetical protein	WP_000691335. 1
4,01448392	groES	co-chaperone GroES	WP_000917311. 1

4,02170415	kdpB	potassium-transporting ATPase subunit KdpB	WP_001248009.1
4,02324466		acetyl-CoA C-acetyltransferase	WP_000552078.1
4,02804627		acetoacetyl-CoA reductase	WP_000250407.1
4,04771335		OFA family MFS transporter	WP_000750124.1
4,05269318		DUF3917 domain-containing protein	WP_000636589.1
4,05697322	fumC	class II fumarate hydratase	WP_000456608.1
4,0661143	glgB	1,4-alpha-glucan branching protein GlgB	WP_001100881.1
4,06819125		amino acid permease	WP_001075751.1
4,08183361		ribbon-helix-helix domain-containing protein	WP_000151932.1
4,08226614		NAD(P)-dependent oxidoreductase	WP_000689909.1
4,08606873		M20 peptidase aminoacylase family protein	WP_000853516.1
4,11393632		DUF1836 domain-containing protein	WP_000447231.1
4,16486846	spoIIM	stage II sporulation protein M	WP_013142149.1
4,16873894		MarR family transcriptional regulator	WP_001059783.1
4,1742315		multidrug efflux SMR transporter	WP_000312339.1
4,20933865		DMT family transporter	WP_000551610.1
4,22827503		patatin family protein	WP_000892676.1

4,23707925		metal-sulfur cluster assembly factor	WP_000076419. 1
4,23875853		nitroreductase family protein	WP_001008498. 1
4,24124813	opuD	glycine betaine transporter OpuD	WP_000591569. 1
4,24864292	mdh	malate dehydrogenase	WP_000153232. 1
4,24944982		septum formation initiator family protein	WP_001228736. 1
4,27419295	phaQ	poly-beta-hydroxybutyrate-responsive repressor	WP_000939954. 1
4,2914552		hypothetical protein	WP_000584358. 1
4,29168917		GrpB family protein	WP_000813517. 1
4,29467971		phosphotransferase	WP_000355256. 1
4,32311687		SGNH/GDSL hydrolase family protein	WP_000855207. 1
4,36101884	arsB	ACR3 family arsenite efflux transporter	WP_000826550. 1
4,36514332		homoserine dehydrogenase	WP_000659109. 1
4,36864296		adenine deaminase C-terminal domain-containing protein	WP_000531414. 1
4,38307028		autorepressor SdpR family transcription factor	WP_001070531. 1
4,38859216	etfA	electron transfer flavoprotein subunit alpha	WP_000101946. 1
4,38979315		aminopeptidase P family protein	WP_000842977. 1
4,40124925		DUF1700 domain-containing protein	WP_001042975. 1

4,40335973		purine/pyrimidine permease	WP_000697130. 1
4,41679668		NUDIX hydrolase	WP_000366246. 1
4,42186226	ilvC	ketol-acid reductoisomerase	WP_000861146. 1
4,42646693		helix-turn-helix transcriptional regulator	WP_001259911. 1
4,43320851		alpha/beta fold hydrolase"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
4,44158926		hypothetical protein	WP_000235474. 1
4,44395179		hypothetical protein	WP_001250164. 1
4,45010279		sulfite exporter TauE/SafE family protein	WP_000974667. 1
4,47177834		MFS transporter	WP_001186932. 1
4,47842977		protein phosphatase 2C domain-containing protein	WP_002040904. 1
4,48643443		hypothetical protein	WP_000449497. 1
4,48948546		zinc-binding dehydrogenase	WP_000644517. 1
4,51655753		class I adenylate-forming enzyme family protein	WP_003271117. 1
4,51943296		hypothetical protein	WP_001119409. 1
4,53431074		alpha/beta hydrolase	WP_014481994. 1
4,54274398		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_001072324. 1
4,56696724		class I SAM-dependent methyltransferase	WP_000031312. 1

4,58086941		hypothetical protein	WP_000880630. 1
4,59808207		LysR substrate-binding domain-containing protein	WP_000423235. 1
4,60841019		nitroreductase	WP_000214818. 1
4,62159151		M20 family metallopeptidase	WP_000501365. 1
4,62588791		hypothetical protein	WP_003270870. 1
4,62784947		ABC transporter ATP-binding protein	WP_001187058. 1
4,62942518	phaC	class III poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase subunit PhaC	WP_000206336. 1
4,63275809		hemolysin family protein	WP_000402259. 1
4,64999701		Nramp family divalent metal transporter	WP_001030686. 1
4,65401541		PhzF family phenazine biosynthesis isomerase	WP_000849312. 1
4,65788442		GNAT family protein	WP_000775343. 1
4,68284387	fadH	2,4-dienoyl-CoA reductase	WP_000660898. 1
4,68717819		Cof-type HAD-IIB family hydrolase	WP_001041229. 1
4,71969615		FAD-linked oxidase C-terminal domain-containing protein	WP_000406574. 1
4,73649861		3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase family protein	WP_000486359. 1
4,75925258		MFS transporter	WP_000097160. 1
4,7721346		MFS transporter	WP_000757907.

			1
4,77277626		zinc-dependent alcohol dehydrogenase family protein	WP_000647249. 1
4,77618013		hypothetical protein	WP_000417221. 1
4,79778303		hypothetical protein	WP_001104104. 1
4,82253765		glutamate synthase-related protein	WP_000935316. 1
4,86821186		heavy metal-binding domain-containing protein	WP_000637523. 1
4,87884643		MerR family transcriptional regulator	WP_000285639. 1
4,8855213		NADPH-dependent FMN reductase	WP_000780357. 1
4,89939843		flotillin family protein	WP_000154998. 1
4,91597153		NADP-dependent oxidoreductase	WP_000644578. 1
4,91819966	pcp	pyroglutamyl-peptidase I	WP_000859711. 1
4,91848084		DUF1700 domain-containing protein	WP_000031386. 1
4,94767072		Rrf2 family transcriptional regulator	WP_000704073. 1
4,94828509	groEL	chaperonin GroEL	WP_001029992. 1
4,95594783		NfeD family protein	WP_001173146. 1
4,95809977	glgD	glucose-1-phosphate adenylyltransferase subunit GlgD	WP_000504170. 1
4,97652471		hypothetical protein	WP_001192000. 1

4,98812629		SdpI family protein	WP_000716359. 1
4,99117326	hrcA	heat-inducible transcriptional repressor HrcA	WP_000954942. 1
5,02334361		PadR family transcriptional regulator	WP_000429488. 1
5,0493547		hypothetical protein	WP_000391447. 1
5,05783998		Lrp/AsnC family transcriptional regulator	WP_000446098. 1
5,08999872	tatC	twin-arginine translocase subunit TatC	WP_000390119. 1
5,09238384		ABC transporter permease	WP_001266724. 1
5,10661931		hydrolase	WP_000028688. 1
5,10706283	hisS	histidine--tRNA ligase	WP_000425313. 1
5,17292465		PadR family transcriptional regulator	WP_001102628. 1
5,18139367		nitroreductase family protein	WP_002093949. 1
5,18668398		sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	WP_000642663. 1
5,19068098		DUF3948 family protein	WP_001060018. 1
5,20264356		hypothetical protein	WP_000461779. 1
5,20913542		hypothetical protein	WP_000865009. 1
5,21024912		NDxxF motif lipoprotein	WP_000760975. 1
5,2269485		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_001168191. 1

5,23504023		PRK06770 family protein	WP_000897992. 1
5,28177219	tkt	transketolase	WP_000193054. 1
5,30024224	rocF	arginase	WP_000711563. 1
5,30490154		ATP-binding cassette domain-containing protein	WP_001196381. 1
5,36587782		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000798236. 1
5,44653219		hypothetical protein	WP_000991350. 1
5,48809419		DUF3813 domain-containing protein	WP_000527408. 1
5,50354522		MarR family winged helix-turn-helix transcriptional regulator	WP_001048563. 1
5,50628246		YitT family protein	WP_001241256. 1
5,52744118	msrA	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase MsrA	WP_001291884. 1
5,53849656		RidA family protein	WP_001169705. 1
5,57200944		cytochrome P450"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
5,61153508	nfsA	oxygen-insensitive NADPH nitroreductase	WP_001002379. 1
5,63480392	aspS	aspartate--tRNA(Asn) ligase	WP_000377339. 1
5,6662045		DsbA family oxidoreductase	WP_000687922. 1
5,70890978		NUDIX hydrolase	WP_000757628. 1
5,73529162		BA3454 family stress response protein	WP_000573532. 1

5,74506905	zwf	glucose-6-phosphate dehydrogenase	WP_000445356. 1
5,7542069		sensor histidine kinase	WP_000744326. 1
5,78368211		TetM/TetW/TetO/TetS family tetracycline resistance ribosomal protection protein	WP_000207806. 1
5,79839491		NAD kinase	WP_000785186. 1
5,85314799		amidohydrolase family protein	WP_000219590. 1
5,86476928		ABC transporter permease	WP_000880730. 1
5,89300841	bsh	choloylglycine hydrolase	WP_000337588. 1
5,92912258		DUF3902 family protein	WP_000843829. 1
5,94292085		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_000822622. 1
5,95308988		acetyl-CoA C-acetyltransferase	WP_001206331. 1
5,97421896		DUF979 domain-containing protein	WP_001021658. 1
5,97735901		glycine betaine ABC transporter substrate-binding protein	WP_001227615. 1
5,97735901		hypothetical protein	WP_000145638. 1
6,01951381		RNA polymerase subunit sigma-70	WP_000337521. 1
6,02901689		toxic anion resistance protein	WP_000137402. 1
6,03367596		GNAT family N-acetyltransferase	WP_000405867. 1
6,04295975		DUF4097 family beta strand repeat-containing protein	WP_000976233. 1

6,04912262	gerE	spore germination transcription factor GerE	WP_000659484. 1
6,0709581		hypothetical protein	WP_000341062. 1
6,08969874		DUF3912 family protein	WP_001008326. 1
6,098178		DUF4398 domain-containing protein	WP_000736436. 1
6,14675486	clpP	ATP-dependent Clp endopeptidase proteolytic subunit ClpP	WP_000991612. 1
6,15742788		hypothetical protein	WP_000914478. 1
6,1784609		MarR family transcriptional regulator	WP_000608841. 1
6,23076306		DUF2332 domain-containing protein	WP_000337428. 1
6,29386092		thioesterase family protein	WP_000822727. 1
6,32088995		metalloregulator ArsR/SmtB family transcription factor	WP_000918378. 1
6,34764463		hypothetical protein	WP_000801636. 1
6,47619067		SdpI family protein"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
6,48890359		MarR family transcriptional regulator	WP_000133921. 1
6,49851686		hypothetical protein	WP_000798784. 1
6,50747674		DUF1048 domain-containing protein	WP_000891986. 1
6,66993272	hmoA	heme-degrading monooxygenase HmoA	WP_000469496. 1
6,678578	kdpA	potassium-transporting ATPase subunit KdpA	WP_000638329. 1

6,68493422		response regulator transcription factor	WP_000598707. 1
6,70560544		DUF3974 domain-containing protein	WP_000008372. 1
6,71681566	proC	pyrroline-5-carboxylate reductase	WP_001133009. 1
6,72589372	liaF	cell wall-active antibiotics response protein LiaF	WP_000716094. 1
6,7288596		VOC family protein	WP_000511528. 1
6,88310691		ATP synthase subunit I	WP_000613874. 1
6,96323845		ABC transporter permease	WP_000265452. 1
6,96339631		heavy metal translocating P-type ATPase	WP_000796571. 1
7,00601924		organic hydroperoxide resistance protein	WP_000359774. 1
7,09788644		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_000798533. 1
7,10366897	mgtE	magnesium transporter	WP_000734826. 1
7,19714244		YhzD family protein	WP_000539550. 1
7,20866947		class I SAM-dependent methyltransferase	WP_000405128. 1
7,23715783		hypothetical protein	WP_003271231. 1
7,23880393		hypothetical protein	WP_001019968. 1
7,24764286		hypothetical protein	WP_001004567. 1
7,41324005	pepF	oligoendopeptidase F	WP_000848817. 1

7,58275119		efflux RND transporter permease subunit	WP_001033497. 1
7,59778811		DUF3533 domain-containing protein	WP_000916717. 1
7,76502957		acyl-CoA dehydrogenase family protein	WP_000416293. 1
7,77926637	kynU	kynureninase	WP_000276304. 1
7,82748589	namA	NADPH dehydrogenase NamA	WP_001086179. 1
7,83939475		aspartyl-phosphate phosphatase Spo0E family protein	WP_000417698. 1
7,83990605		hypothetical protein	WP_000008903. 1
7,86502687		LLM class flavin-dependent oxidoreductase	WP_000594040. 1
7,91855773		hypothetical protein	WP_000415617. 1
8,00908999		aldo/keto reductase	WP_000604196. 1
8,04479449	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	WP_001007616. 1
8,16424437		hypothetical protein	WP_000832166. 1
8,22514017		Nif3-like dinuclear metal center hexameric protein	WP_001022444. 1
8,23003391		ABC transporter permease	WP_000837816. 1
8,25735086		histidine phosphatase family protein"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
8,40796827		hypothetical protein	WP_000697471. 1
8,43741167		YxcD family protein	WP_000447762. 1

8,49825063		hypothetical protein	WP_000050626. 1
8,53042564		class I SAM-dependent methyltransferase	WP_003270732. 1
8,9234006		phosphodiester glycosidase family protein	WP_000681839. 1
8,94135465		hypothetical protein	WP_001099749. 1
8,94135465		hypothetical protein	WP_000849112. 1
8,97371962	lysA	diaminopimelate decarboxylase	WP_000280643. 1
9,16591751		AraC family transcriptional regulator	WP_000762794. 1
9,18947009		DUF3238 domain-containing protein	WP_000182102. 1
9,20657084		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000017471. 1
9,26575489	kynB	arylformamidase	WP_000858074. 1
9,52111744	lysS	lysine--tRNA ligase	WP_000558614. 1
9,57251864		hypothetical protein	WP_000945243. 1
9,58321153	saiR	Rrf2-family transcriptional regulator SaiR	WP_001083465. 1
9,66550166		GNAT family protein	WP_000494680. 1
9,77827516		hypothetical protein	WP_000031873. 1
9,85004929	spxA	transcriptional regulator SpxA	WP_000236188. 1
9,86693151		FtsW/RodA/SpoVE family cell cycle protein	WP_000722120. 1

9,9054204		enoyl-CoA hydratase	WP_003269647. 1
9,93338218	arsC	arsenate reductase (thioredoxin)	WP_001284548. 1
10,0563167		oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	WP_001039729. 1
10,0872897		hypothetical protein	WP_001248905. 1
10,4558934		transporter suffix domain-containing protein	WP_000409981. 1
10,5003209		TetR/AcrR family transcriptional regulator	WP_003291871. 1
10,5373837		YflJ family protein	WP_000273536. 1
10,6491194		ABC transporter ATP-binding protein	WP_000626565. 1
10,7439947	clpP	ATP-dependent Clp endopeptidase proteolytic subunit ClpP	WP_001049162. 1
11,0194667		VOC family protein	WP_001145268. 1
11,2484208		DUF3238 domain-containing protein	WP_000247262. 1
11,4089119		GNAT family N-acetyltransferase	WP_001003161. 1
12,0877062		monooxygenase	WP_000323765. 1
12,2039227		cell wall hydrolase	WP_001128402. 1
13,3593974		SipW-dependent-type signal peptide-containing protein	WP_000887894. 1
13,4243546		ABC transporter permease subunit	WP_001041425. 1
13,6346959	kynA	tryptophan 2,3-dioxygenase	WP_000661957. 1

13,9798799		protein arginine kinase	WP_000050836. 1
14,2279256		magnesium transporter CorA family protein	WP_000388919. 1
14,6878235	clpB	ATP-dependent chaperone ClpB	WP_000365411. 1
14,7030802		cation:proton antiporter	WP_000393901. 1
15,5625074	clpC	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpC	WP_000971170. 1
15,5974153		UvrB/UvrC motif-containing protein	WP_000128385. 1
16,5997848	ctsR	transcriptional regulator CtsR	WP_001244560. 1
16,6661638		IDEAL domain-containing protein	WP_000987464. 1
18,1349131		DoxX family protein	WP_024927972. 1
18,5895795		MFS transporter	WP_000502472. 1
20,9603004		catalase	WP_001035761. 1
21,0249549	rsbV	anti sigma b factor antagonist RsbV	WP_002106052. 1
23,5901401		amino acid permease	WP_001083396. 1
29,0879707		DUF1304 domain-containing protein	WP_000402492. 1
30,8334826		general stress protein	WP_001100088. 1
31,1070677		type 1 glutamine amidotransferase domain-containing protein	WP_000037549. 1
35,3080892		YjcZ family sporulation protein	WP_000540375. 1

35,3080892			
35,3080892	spoIIIAC	stage III sporulation protein AC	WP_000020914. 1
38,2300074		DUF4028 family protein	WP_003269707. 1
39,3233085	rsbW	anti-sigma B factor RsbW	WP_003269702. 1
39,6406051		HXXEE domain-containing protein"; pseudo "true"; transl_table "11"; exon_number "1";	
42,6985203		MarR family transcriptional regulator	WP_000942494. 1
43,8851115		DinB family protein	WP_000653846. 1
48,3682621		hypothetical protein	WP_000391019. 1
52,6569471		ferritin-like domain-containing protein	WP_000017752. 1
54,2799331	sigB	RNA polymerase sigma factor SigB	WP_015055091. 1
55,5074968		aspartate kinase	WP_000448069. 1
61,0391561		helix-turn-helix transcriptional regulator	WP_000900759. 1
61,0391561		hypothetical protein	WP_223618161. 1
78,1932006		YokU family protein	WP_000995766. 1
92,5469888		general stress protein	WP_000448820. 1
110,14693		ParM/StbA family protein	WP_000839425. 1
117,799454		nitroreductase family protein	WP_000185375. 1

125,249175	GlsB/YeaQ/YmgE family stress response membrane protein	WP_000522903. 1
129,006635	MarR family transcriptional regulator	WP_000204172. 1
144,836526	putative quinol monooxygenase	WP_000583843. 1
156,329189	hypothetical protein	WP_000683219. 1
163,634005	CsbD family protein	WP_000004263. 1
189,69449	DUF3888 domain-containing protein	WP_000702350. 1
217,314533	general stress protein	WP_000557321. 1
228,520159	ArsA family ATPase	WP_002182396. 1
247,93906	PspA/IM30 family protein	WP_000814127. 1
347,917727	DUF3926 domain-containing protein	WP_000544108. 1
375,452857	hypothetical protein	WP_000808640. 1

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Schneider Gy., Schweitzer B., Kovács T. *Bacillus thuringiensis*: a causative agent of pitted keratolysis. *Australasian Journal of Dermatology*. 2021; 62 (4):610.

Schweitzer B., Balázs V.L., Molnár Sz., Szögi-Tatár B., Böszörményi A., Palkovics T., Horváth Gy., Schneider Gy. Antibacterial effect of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) against the aetiological agents of pitted keratolysis. *Molecules*. 2022; 19;27(4):1423.

A dolgozat alapjául nem szolgáló egyéb közlemények:

Schneider Gy., Schweitzer-B., Steinbach A., Pertics B.ZS., Cox A., Kőrösi L. Antimicrobial Efficacy and Spectrum of Phosphorous-Fluorine Co-Doped TiO₂ Nanoparticles on the Foodborne Pathogenic Bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Typhimurium, Enterohaemorrhagic *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shewanella putrefaciens*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Foods*. 2021; 10(8):1786.

**TABLE 1** Diagnostic criteria of malignancy-associated Sweet syndrome and drug-induced Sweet syndrome adapted from Cohen 2007

Malignancy-associated Sweet syndrome*	Drug-induced Sweet syndrome**
1) Abrupt onset of painful erythematous nodules or plaques	A) Abrupt onset of painful erythematous plaques or nodules
2) Dense neutrophilic infiltrate without evidence of leukocytoclastic vasculitis	B) Dense neutrophilic infiltrate without evidence of leukocytoclastic vasculitis
3) Fever >38°C	C) Fever >38°C
4) Association with an underlying haematological or visceral malignancy	D) Temporal relationship between drug ingestion and clinical presentation, OR temporally related recurrence after oral challenge
5) Responds to systemic corticosteroids or potassium iodide	E) Resolution of lesions is temporally related to the withdrawal of drug or treatment with systemic corticosteroids
6) Abnormal laboratory values at presentation (three of four): ESR > 20mm/hr; positive C-reactive protein (CRP); >8,000 leukocytes; >70% neutrophils	

*To establish the diagnosis of malignancy-associated Sweet syndrome, the presence of both major criteria (1 and 2) and two of the minor criteria (3, 4, 5 and 6) are required.

**To establish the diagnosis of drug-induced Sweet syndrome, all five criteria (A, B, C, D, and E) are required.

pyoderma gangrenosum could not be excluded as a differential. G-CSF is considered a less likely causative agent as the onset of pyrexia and terminal ileal involvement preceded the commencement of G-CSF. The literature does not support danazol as a potential causative agent, and there is a more plausible pharmacological mechanism to implicate ruxolitinib.

Consistent with the literature, lesions resolved after a course of 37.5mg of prednisolone and topical application of betamethasone dipropionate ointment, without necessitating withdrawal of ruxolitinib. (5) No further lesions arose after ruxolitinib was eventually ceased. Moreover, this case demonstrated a convincing temporal relationship with lesions appearing five weeks after commencing tyrosine kinase inhibitor therapy; this aligns well with the median two-month latency time reported in the literature. (5)

As clinical applications for JAK-2 inhibitors grow in dermatology, better characterisation of and surveillance for the possible adverse cutaneous effects are becoming increasingly important.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to acknowledge the Pathology Department at Flinders Medical Centre.

PATIENT CONSENT FOR PUBLICATION STATEMENT

The patient has consented to the use of his de-identified information, laboratory and clinical findings and images for the purpose of forming a case report for scientific publication.

Melinda Jiang¹ | Alain Khoi Tran² | Gillian Marshman^{1,2}

¹College of Medicine and Public Health, Flinders University, Bedford Park, Australia and ²Department of Dermatology, Flinders Medical Centre, Bedford Park, Australia

REFERENCES

- Chatterjee B, Rqieh U, Greaves P *et al.* Sweet syndrome as terminal event in ruxolitinib-treated myelofibrosis. *Br J Haematol* 2015; **169**: 307.
- Sakoda T, Kanamitsu Y, Mori Y *et al.* Recurrent Subcutaneous Sweet's Disease in a Myelofibrosis Patient Treated with Ruxolitinib before Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Intern Med* 2017; **56**(18): 2481–2485.
- Thebo U, Tummala S, Nassereddine S *et al.* An atypical presentation of Sweet's syndrome in a myelofibrosis patient. *BMJ Case Rep* 2019; **12**(3): e228076.
- Gowda A, Christensen L, Polly S *et al.* Necrotizing neutrophilic dermatosis: A diagnostic challenge with a need for multi-disciplinary recognition, a case report. *Annals of Medicine and Surgery* 2020; **57**: 299–302.
- Yang JJ, Maloney NJ, Nguyen KA *et al.* Sweet syndrome as an adverse reaction to tyrosine kinase inhibitors: A review. *Dermatol. Ther.* 2020; **34**(1).

doi: 10.1111/ajd.13718

Case Letter

Dear Editor,

Bacillus thuringiensis: a causative agent of pitted keratolysis

A 45-year-old man presented with a prolonged history of malodour and burning irritation of his soles. He previously treated himself with an antifungal ointment without improvement. Small pits and crateriform erosions affecting the stratum corneum—typical symptoms of pitted keratolysis¹—were observed on physical examination. Pits and craters were localised on both soles on the weight-bearing

Funding: Hungarian Government GINOP 2.1.7-15
Conflict of interest: None

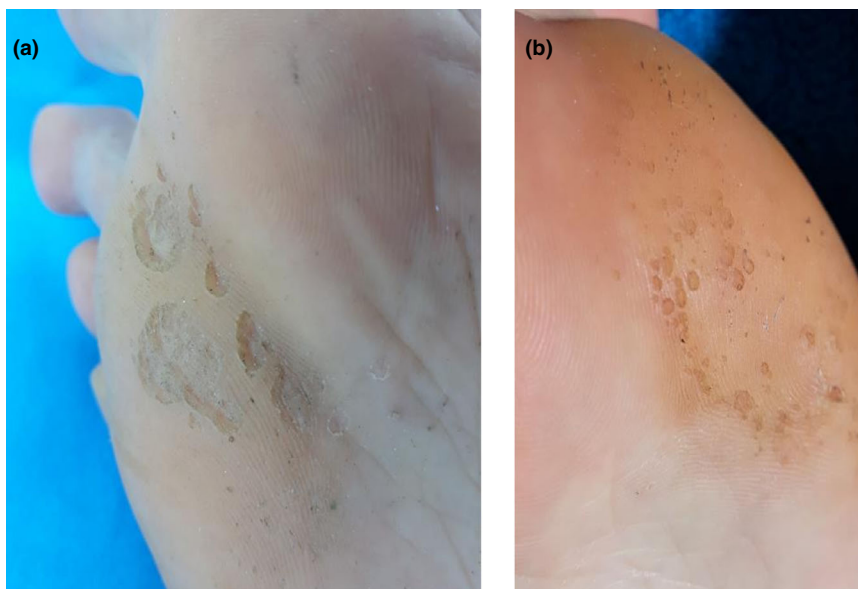


FIGURE 1 Deep, confluent erosions were localised on the metatarsal region of the right forefoot (a), and small pits were present on the other weight bearing parts of both soles (b)

areas of the forefoot and heels, and deeper crateriform lesions were present on the metatarsal region of the right sole (Fig. 1).

Tinea pedis was excluded with Wood light examination that clearly indicated the pure bacterial origin of the infection. Skin scrapings were taken from 6 pits from the ball of the left sole and 6 crateriform erosions from the ball of the right sole. The presence of fungus was excluded with

native light microscopic investigation. After homogenisation, samples were spread on Luria Bertani agar (LBA), brain heart infusion agar (BHIA), blood agar (BA), anaerobic blood agar (ABA) and Sabouraud agar (SA) plates. LBA, BHIA, BA and SA plates were incubated for 24 h under aerobic and elevated (5%) CO₂ conditions, whereas ABA plates were incubated for 48 h under anaerobic conditions. SA and anaerobic plates were declared as negative after 7 and 14 days, respectively. Ten colonies from each morphotypes were collected from the plates and identified with matrix-assisted laser desorption/ionisation–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and, in one case, with 16S rRNA sequence determination by using the universal prokaryotic 16S rRNA primers, Uni16S27_F and Uni16S1492_R.²

Altogether six bacterium species were identified from the lesions with MALDI-TOF MS. *Bacillus thuringiensis* could be detected in each lesion, and the presence of *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus parasanguinis* and *Streptococcus mitis* was limited to up to three lesions (Table S1). Sequence determination of the 16S rRNA coding DNA region of the sixth isolate revealed a 99% homology to different *Macrococcus* species (GenBank: MZ577562).

B. thuringiensis was the only species that could be detected from every lesion and showed the strongest proteolytic activity (Table S2), a characteristic feature in pitted keratolysis progression.

Pitted keratolysis is a superficial skin infection affecting the stratum corneum.³ Although the roles of predisposing factors like hyperhidrosis, elevated skin pH, poor foot hygiene, obesity and immunodeficiency were recently demonstrated, pitted keratolysis can affect healthy



FIGURE 2 Detection of the characteristic protease activity of the *B. thuringiensis* isolate on milk agar test


patients of different socio-economic statuses and ages, typically in people wearing occlusive shoes, including athletes, sailors, soldiers or patients living in humid, tropical countries.^{4,5}

Today, therapy for pitted keratolysis is empiric and based on topical or oral antibiotics, primarily erythromycin and clindamycin. The remarkable number of registered therapeutic failures and recurrences⁵ justifies the need for a more thorough investigation of the aetiological agents of pitted keratolysis, knowledge of which is limited and relies on the few early observations where the roles of *Actinomyces keratolytica*, *Streptomyces*, *Corynebacterium* species, *Dematophilus congolensis* and *Kytococcus sedentarius* were reported.⁴

In this case report, we have identified *B. thuringiensis*, a Gram-positive, spore-forming bacterium, from the lesions of pitted keratolysis case. Its presence in all the investigated lesions and its strong keratolytic activity (Fig. 2) suggests its flagship role in this skin disease, and others were either normal skin microbiota or opportunistic. After identification, a 7-day topical erythromycin (2%) therapy was successfully performed. As a result unpleasant symptoms were eliminated in three days, but crateriform lesions disappeared only in months.

ACKNOWLEDGEMENTS

None

György Schneider¹  | Bettina Schweitzer¹ | Tamás Kovács²

¹Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs Clinical Center, Pécs, Hungary and ²Department of Biotechnology, Nanophagetherapy Center, Environinvest Corporation, Pécs, Hungary

REFERENCES

1. Singh G, Naik CL. Pitted keratolysis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2005; **71**: 213–5.
2. Tabei Y, Ueno K. Phylogenic analysis of bacteria passed through 0.45-µm-pore-size filters in the rhizosphere. *J Gen Appl Microbiol* 2010; **56**: 129–56.
3. Fernández-Crehuet P, Ruiz-Villaverde R. Pitted keratolysis: an infective cause of foot odour. *CMAJ* 2015; **187**: 519.
4. Takama H, Tamada Y, Yano K *et al.* Pitted keratolysis: clinical manifestations in 53 cases. *Br J Dermatol* 1997; **137**: 282–5.
5. Kaptanoglu AF, Yuksel O, Ozyurt S. Plantar pitted keratolysis: a study from non-risk groups. *Dermatol Rep* 2012; **4**: e4.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in Supporting Information:

Table S1–S2.

doi: 10.1111/ajd.13682

Case Letter

Dear Editor,

A rare case of congenital cutaneous mucinosis with spontaneous regression

INTRODUCTION

Cutaneous mucinosis of infancy (CMI) is a rare subtype of localised lichen myxedematosus with a few congenital cases reported in literature.¹ CMI occurs at birth or infancy, without systemic involvement, monoclonal gammopathy or thyroid disease.² It is usually a persistent disorder, with rare reports of spontaneous regression.¹ We report a case of congenital CMI which resolved spontaneously.

CASE REPORT

A full-term, baby boy, third born to second-degree consanguineous parents presented with an extensive rash over the trunk and extremities since birth. Antenatal and perinatal periods were uneventful. There were multiple, skin-coloured and yellowish, opalescent tiny firm papules coalescing into thin plaques, with intervening normal skin over the chest extending to costal margins (Fig. 1a). Similar lesions were present linearly over the shoulder, arms and forearms. Discrete, thin yellowish-orange plaques were seen over the knuckles, proximal interphalangeal joints, and dorsa of great toes (Fig. 1b,c). He had post-axial polydactyly of the left hand. Darier's sign was negative. There was no lymphadenopathy or organomegaly. The possibility of infiltrative conditions such as cutaneous mucinosis, non-Langerhans cell histiocytosis, mastocytosis and nevoid disorder including systematised nevus sebaceous were considered. Skin biopsy showed an epidermis with psoriasiform hyperplasia, patchy mucin deposition in the superficial dermis, highlighted by colloidal iron with proliferating small calibre blood vessels and dermal fibrosis (Fig. 2). Neonatal thyroid-stimulating hormone level was normal. After clinicopathological correlation, a final diagnosis of CMI was made. The child was reviewed fortnightly, and the rash resolved spontaneously with residual dyspigmentation within six weeks (Fig. 1d-f).

Conflict of Interest: There are no conflicts of interest

Funding: Nil

Consent statement: The authors certify that they have obtained all appropriate patient consent forms from the parent(s)/guardian(s) for their images and other clinical information to be reported in the journal.

Article

Antibacterial Effect of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) against the Aetiological Agents of Pitted Keratolysis

Bettina Schweitzer ¹, Viktória Lilla Balázs ², Szilárd Molnár ³ , Bernadett Szögi-Tatár ⁴ , Andrea Böszörményi ⁴, Tamás Palkovics ¹, Györgyi Horváth ²  and György Schneider ^{1,*} 

¹ Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary; scbtapt.pte@pte.hu (B.S.); palkovics.tamas@pte.hu (T.P.)

² Department of Pharmacognosy, University of Pécs, Rókus u. 2, H-7624 Pécs, Hungary; balazsviktoralilla@gmail.com (V.L.B.); horvath.gyorgyi@gytk.pte.hu (G.H.)

³ Research Institute for Viticulture and Oenology, University of Pécs, Pázmány Péter u. 4, H-7634 Pécs, Hungary; molnar.szilard@freemail.hu

⁴ Department of Pharmacognosy, Semmelweis University, Üllői u. 26., H-1085 Budapest, Hungary; szogi-tatar.bernadett@pharma.semmelweis-univ.hu (B.S.-T.); boszormenyi.andrea@pharma.semmelweis-univ.hu (A.B.)

* Correspondence: gyorgy.schneider@aok.pte.hu; Tel.: +36-72-536 200 (ext. 1908)

Abstract: Pitted keratolysis (PK) is a bacterial skin infection mostly affecting the pressure-bearing areas of the soles, causing unpleasant symptoms. Antibiotics are used for therapy, but the emergence of antibiotic resistance, makes the application of novel topical therapeutic agents necessary. The antibacterial effects of 12 EOs were compared in the first part of this study against the three known aetiological agents of PK (*Kytococcus sedentarius*, *Dermatophilus congolensis* and *Bacillus thuringiensis*). The results of the minimal inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration and spore-formation inhibition tests revealed that lemongrass was the most effective EO against all three bacterium species and was therefore chosen for further analysis. Seventeen compounds were identified with solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS) analysis while thin-layer chromatography combined with direct bioautography (TLC-BD) was used to detect the presence of antibacterially active compounds. Citral showed a characteristic spot at the R_f value of 0.47, while the HS-SPME/GC-MS analysis of an unknown spot with strong antibacterial activity revealed the presence of α -terpineol, γ -cadinene and calamenene. Of these, α -terpineol was confirmed to possess an antimicrobial effect on all three bacterium species associated with PK. Our study supports the hypothesis that, based on their spectrum, EO-based formulations have potent antibacterial effects against PK and warrant further investigation as topical therapeutics.

Keywords: lemongrass; antibacterial; gas chromatography; bioautography; solid-phase microextraction; compound identification; pitted keratolysis



Citation: Schweitzer, B.; Balázs, V.L.; Molnár, S.; Szögi-Tatár, B.; Böszörményi, A.; Palkovics, T.; Horváth, G.; Schneider, G. Antibacterial Effect of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) against the Aetiological Agents of Pitted Keratolysis. *Molecules* **2022**, *27*, 1423. <https://doi.org/10.3390/molecules27041423>

Academic Editor: Lillian Barros

Received: 13 January 2022

Accepted: 15 February 2022

Published: 19 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pitted keratolysis (PK) is an acquired, chronic, non-inflammatory, superficial bacterial infection of the skin, confined to the stratum corneum of the soles. It is clinically characterized by multifocal, discrete, superficial crateriform pits and superficial erosions usually on the pressure-bearing areas on the soles of the feet, and rarely on the palms [1]. PK can affect patients of any age. Typical symptoms are described in healthy people wearing occlusive shoes, for example, athletes, sailors and soldiers [2]; aged, hospitalized patients [3]; and citizens of flooded areas, mostly from developing, under-resourced communities in humid, tropical countries [4]. Other predisposing factors include hyperhidrosis, elevated skin pH, poor foot hygiene, obesity, and immunodeficiency [5]. Malodour, the most characteristic symptom, is caused by sulfur compounds (thiols, sulfides, and thioesters) produced by the

protease enzymes of the colonizing bacteria [5]. *Kytococcus* (formerly *Micrococcus*) *sedentarius* and *Dermatophilus congolensis* were documented as aetiological agents of PK [6,7], and in a very recent study the aetiological role of the Gram-positive, spore-forming *Bacillus thuringiensis* was demonstrated [8].

Today, the treatment of PK is primarily empiric, and is based on antibiotics, such as erythromycin, tetracycline and clindamycin. However, the spread of antibiotic resistance among the bacterial isolates limits therapeutic success [9].

Due to their antibacterial features, the use of essential oils (EOs) is a potential way to combat emerging antibiotic resistance [10]. EOs are secondary metabolites of aromatic plants consisting of ~20–60 components at different concentrations. There can be major compounds at relatively high concentrations (20–70%) compared to other components present in trace amounts [11].

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, commonly known as lemongrass, is a coarse grass with a strong lemon taste. It is a perennial herb widely cultivated in the tropics and subtropics [12]. Researchers have found that lemongrass holds antidepressant, antioxidant, antiseptic, astringent, nervine and sedative properties [13]. Furthermore, the antibacterial activity of lemongrass oil against a diverse range of species comprising Gram-positive and Gram-negative organisms, along with yeast and fungi, was formerly established [13–15]. The major component of lemongrass EO is citral, consisting of the two geometric isomers citral A (geranial) and citral B (neral) [16]. Other compounds identified in lemongrass EO include limonene, citronellal, β -myrcene and geraniol [16], along with trace compounds [17]. On the compound level, citral, the major component of lemongrass EO, is known to be antibacterial, but other compounds have not yet been studied in detail from this perspective. Furthermore, an earlier study has also reported about the capacity of thyme EO, cinnamon EO and lemongrass EO to reduce viable spores [18], which could be an important feature of these EOs, as *B. thuringiensis*, one aetiological agent of pitted keratolysis, is a typical spore-forming bacterium species, and spore formation can influence survival and therefore therapeutic success [19].

The aim of this study was to screen the antibacterial potential of certain EOs against all the known aetiological agents of pitted keratolysis and try to reveal the most effective EO from an antibacterial point of view, including growth- and spore-formation inhibitions and bactericid effects. To best of our knowledge, this is the first study where these aspects were investigated in relation to the aetiological agents of PK, by combining antibacterial screenings, such as the drop plate method, minimal inhibitory and minimal bactericidal concentration determinations, spore-formation suppression test and analytic methods such as (TLC-DB) and headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS) and thin-layer chromatography combined with direct bioautography (TLC-DB).

2. Results

2.1. Antibacterial Effects of EOs—Drop Plate Method

The antibacterial efficacy of 12 EOs showed marked differences using the drop plate method (Figure 1). Based on the diameter (20–36 mm) of the inhibition zones, thyme, cinnamon and lemongrass were the most effective antibacterial EOs against all three investigated bacterium species. Other EOs differed in their efficacies against the different species. Lemon was effective only against *D. congolensis* while salvia only against *K. sedentarius* and *D. congolensis*, and eucalyptus against *B. thuringiensis* and *D. congolensis*. From the bacterial point of view, the most sensitive bacterium was *D. congolensis*, as all EOs had some inhibitory effect on this species (Figure 1).

2.3. Spore-Formation Inhibition Test

No bacterial growth was visually detected after 24 h incubation when the applied lemongrass EO concentrations in the case of the *B. thuringiensis* suspensions were above 0.2 mg/mL (MIC value). Transferring 1 mL from the optically clear tubes above the MIC values into a final volume of 25 mL of the medium, subsequent incubation (24 h at 37 °C) and confirmative outplating revealed that no living bacterium cell was detected in the presence of lemongrass EO at an original concentration of >12.8 mg/mL. In all other cases, no restrictive effect was revealed as the solutions became turbid after the 24 h incubation.

2.4. HS-SPME/GC-MS Analysis

Aromax Ltd.'s lemongrass EO contained 60.6% citral, 34.5% geranial and 26.1% neral. Its minor volatile compounds were caryophyllene-oxide (4.7%), geraniol (4.3%), linalool (2.6%), α -terpineol (1.7%), γ -cadinene (1.4%) and limonene (1.3%) (Figure 2, Table 2).

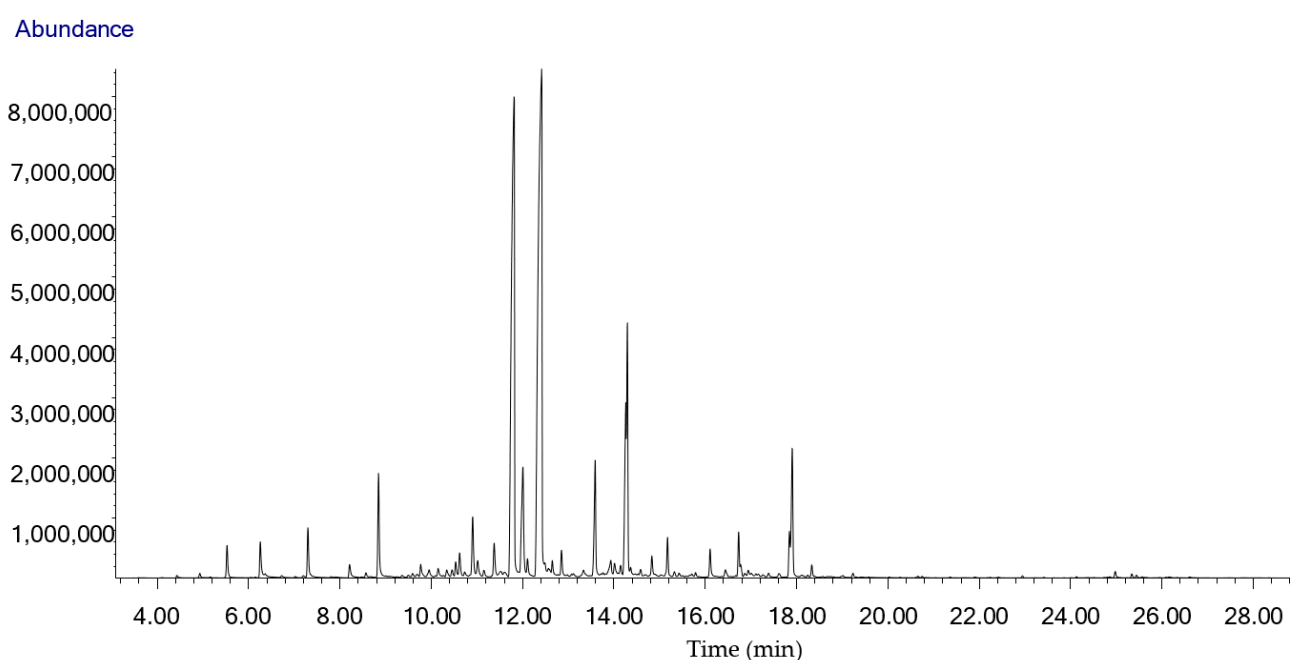


Figure 2. Chromatogram of the HS-SPME/GC-MS analysis of the West Indian lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus*) used in this study obtained from Aromax Ltd. Each compound can be identified based on the data in Table 2 (tR (min)).

2.5. Analysis of Antibacterial Compounds of Lemongrass EO Using Thin-Layer Chromatography Combined with Direct Bioautography

The TLC-DB method was used to reveal the antibacterial components of lemongrass EO. According to the R_f value, the main component of lemongrass EO was citral. This was also confirmed by the commercial citral control. Based on its R_f value, we could not determine the identity of one characteristic spot. This spot was cut out (Figure 3) and analysed further with a preparative chromatographic method.

Table 2. Percentage compound composition of the West Indian lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus*) used in this study. Compounds determined from the outcutted from the TLC-BD plate are labelled with bold.

Name of Compounds	tR (min)	KI	Presence in %	
			Lemongrass EO	Fraction
Camphene	5.5	941	0.8	
Limonene	7.3	1023	1.3	
Linalool	8.8	1091	2.6	
Verbenol	10.5	1171	0.4	
α-Terpineol	10.9	1190	1.7	13.2
Carveol, trans	11.0	1195	0.5	
Carveol, cis	11.4	1216	1.0	
Neral	11.8	1237	26.1	
Geraniol	12.0	1247	4.3	
Piperitone	12.1	1253	0.6	
Geranial	12.4	1268	34.5	
Geranyl formate	12.8	1289	0.7	
Neryl acetate	13.9	1350	0.7	
β -Caryophyllene	15.2	1424	1.0	
Cadinene	16.7	1513	1.4	7.0
Calamenene	16.9	1525	0.6	3.7
Caryophyllene-oxide	17.9	1588	4.7	
Sum			82.2	
M ⁺ 140	6.3	977	0.8	
M ⁺ 155	8.2	1064	0.4	
M ⁺ 152	9.7	1133	0.5	
M+166	10.6	1176	0.6	
M ⁺ 166	12.6	1279	0.4	
M ⁺ 168	13.6	1333	3.2	
M ⁺ 164	14.1	1361	0.4	
M ⁺ 204	14.3	1372	9.8	
M ⁺ 166	14.8	1400	0.6	
M ⁺ 204	16.1	1475	0.7	
Sum			17.4	

2.6. Component Identification with Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (HS-SPME/GC-MS)

As a result of the HS-SPME/GC-MS analysis of the unidentified cut spot isolated from the TLC-bioautography plate, we were able to distinguish nine characteristic peaks and several minor ones (Figure 4). α -Terpineol, γ -cadinene and calamenene abundance were 13.2%, 7.0% and 3.7%, respectively.

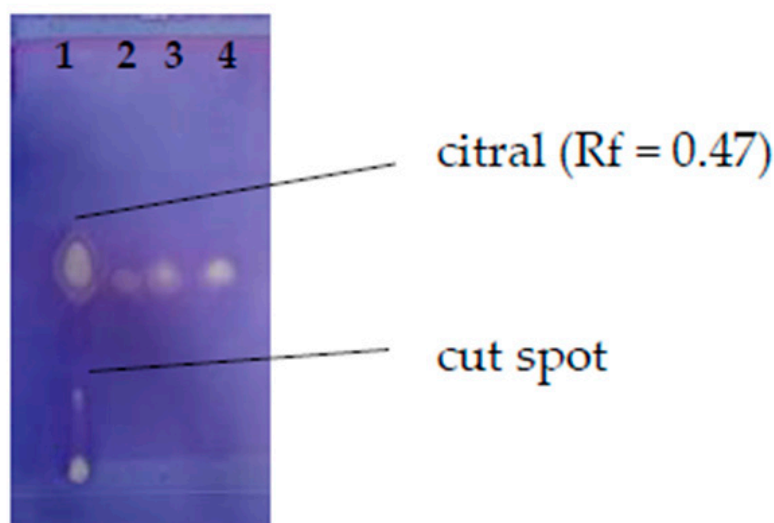


Figure 3. Compounds with antibacterial activities of lemongrass essential oil revealed on *B. thuringiensis* by TLC-DB. Order and quantity of the volatile test materials on the plate was the following: 1-lemongrass EO (0.2 mg); 2-citral (0.02 mg); 3-citral (0.04 mg); 4-citral (0.08 mg).

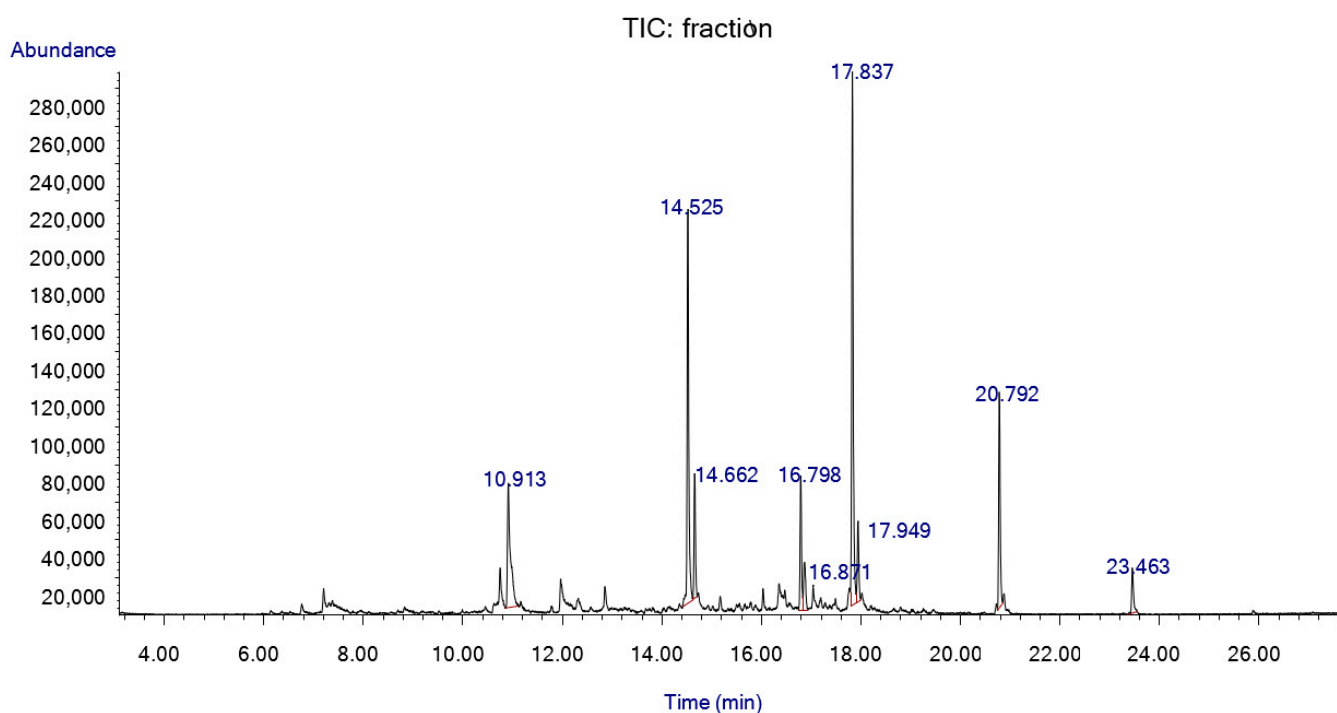


Figure 4. HS-SPME/GC-MS chromatogram of the white cut-out spot from TLC-BD silica plate.

2.7. Antibacterial Effects of Citral and α -Terpineol: Drop Plate Method

Characteristic differences could be observed between the antibacterial activities of citral and α -terpineol using the drop plate method. Citral produced larger clearing zones by diameter with each bacterium species compared to α -terpineol (Table 3). The differences were the most pronounced in *D. congolensis* and *B. thuringiensis*, and were minimal with *K. sedentarius*.

Table 3. Antibacterial effects of citral and α -terpineol (5 μ L) on the three tested bacterium species. Values represent the diameters of the inhibition zones in mm.

	Citral (Diameter in mm)	α -Terpineol (Diameter in mm)
<i>B. thuringiensis</i>	29 \pm 2	17 \pm 3
<i>D. congolensis</i>	23 \pm 2	7 \pm 1
<i>K. sedentarius</i>	14 \pm 2	6 \pm 1

2.8. MIC and MBC of Citral and α -Terpineol

Macrodilution-based antibacterial testing of the citral and α -terpineol revealed that α -terpineol showed weaker antibacterial effects in the applied test range (0.1–12.8 mg/mL) (Table 4). In contrast, citral strongly inhibited the proliferation of all three Gram-positive bacterium species at low MIC and MBC values.

Table 4. Minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations of citral and α -terpineol tested with the macrodilution method. Concentrations are presented in mg/mL.

	Citral		α -Terpineol	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. thuringiensis</i>	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0	0.8 \pm 0	0.8 \pm 0
<i>D. congolensis</i>	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0	0.4 \pm 0	0.8 \pm 0
<i>K. sedentarius</i>	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0	0.4 \pm 0	0.8 \pm 0

2.9. Confirmation the Antibacterial Features of Citral and α -Terpineol with Thin-Layer Chromatography Combined with Direct Bioautography (TLC-DB)

Qualities of the chromatographic separations on the thin-layer silica plates were confirmed before developments by illuminating the TLC plates under UV light (Figures 5A and 6A). Here, some major components or mass of components became visible. Vanilin sulfuric acid developments of one plate from each parallel run revealed the presence of further compounds in the lemongrass EO sample (Figures 5B(1) and 6B(1)). The TLC-based direct bioautography method showed another antibacterially active compound or compound group that was effective against all three tested bacteria (Figures 5C,D and 6C), but was definitely separated in the case of *K. sedentarius* (Figure 5D(1)). In the cases of *B. thuringiensis* and *D. congolensis* (Figures 5C(1) and 6C(1)), the presenting components of lemongrass EO showed a smeared outlook in contrast to *K. sedentarius*.

Lemongrass EO was diluted for application to *B. thuringiensis* and *K. sedentarius*, but not with *D. congolensis*. Citral ($R_f = 0.47$) and α -terpineol ($R_f = 0.36$) were active against both bacteria (Figures 5C,D and 6C).

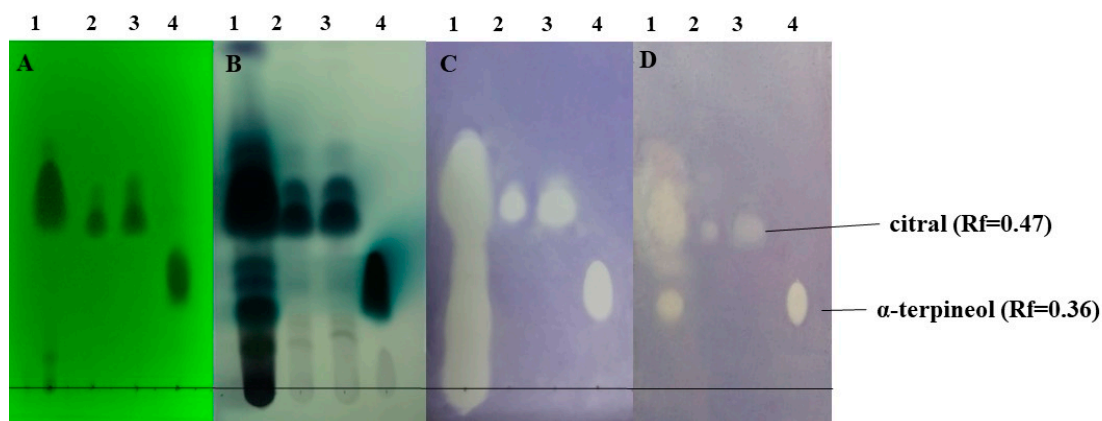


Figure 5. Antibacterial components in the lemongrass EO used in this study after TLC-DB. (A) Plate under UV 254 nm, (B) TLC plate after treatment with vanillin–sulfuric acid reagent and documented in visible light, (C) TLC-DB assay: bioautograms using *B. thuringiensis*, (D) TLC-DB assay: bioautograms using *K. sedentarius* (bright zones indicate antibacterial effects). Mobile phases: dichloromethane and toluene–ethyl acetate 93:7 (*v/v*). The applied volumes of compounds used were as follows: lemongrass EO—6 μ L, citral—4.5 and 6 μ L, α -terpineol—1.5 μ L. The stock solutions had concentrations as follows: lemongrass EO—200 mg/mL, citral—20 mg/mL, α -terpineol—100 mg/mL. Order and quantity of the volatile test materials on each plate were as follows: 1-lemongrass EO (1.2 mg); 2-citral (0.09 mg); 3-citral (0.12 mg); 4- α -terpineol (0.15 mg).

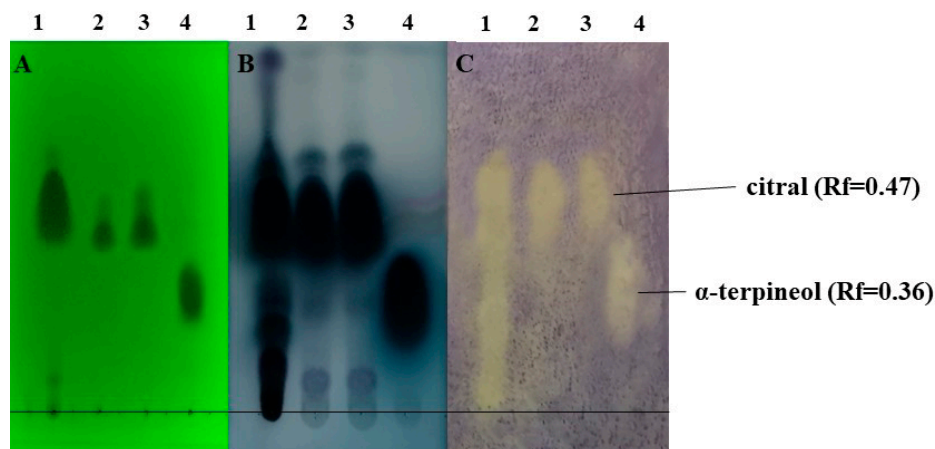


Figure 6. Antibacterial components in the lemongrass EO used in this study after TLC-DB. (A) plate under UV 254 nm, (B) TLC plate after treatment with vanillin–sulfuric acid reagent and documented in visible light, (C) TLC-DB assay: bioautograms using *D. congolensis* (bright zones indicate antibacterial effects). Mobile phases: dichloromethane and toluene–ethyl acetate 93:7 (*v/v*); 1, 4.5 and 6 μ L indicated the applied volumes of the EO and the standards (lemongrass essential oil: 1 μ L, citral: 4.5 and 6 μ L, α -terpineol: 4.5 μ L). The lemongrass essential oil was applied without dilution and the stock solution in the cases of citral and α -terpineol were 100 mg/mL. Order and quantity of the volatile test materials on each plate were as follows: 1-lemongrass essential oil (undiluted); 2-citral (0.45 mg); 3-citral (0.6 mg); 4- α -terpineol (0.45 mg).

3. Discussion

In the present study the antibacterial effects of lemongrass EO against three bacterium species associated with PK were investigated. As a superficial skin infection, PK is an easily accessible target for topical medications, and EO-based gels and ointments are potential therapeutic candidates [20]. The 12 EOs for our antibacterial study were chosen based on earlier publications reporting their antibacterial features [21–30]. No data were

available concerning the sensitivities of the known aetiological agents of PK (*B. thuringiensis*, *Kytococcus sedentarius* and *Dermatophilus congolensis*).

The results of the drop plate method performed with the three tested bacterium species indicated that although the majority of the 12 EOs were antibacterial, this effect was most pronounced in the cases of lemongrass, cinnamon and thyme (Figure 1). The antibacterial potential of the tested EOs was also supported by the MIC and MBC determinations performed in the macrodilution tests, although there were some discrepancies in their efficacies. This may be due to the differing characteristics of the two test methods. The large inhibition zones (>25 mm) and low MIC values (0.1 mg/mL) recorded here related to thyme EO confirm the findings of previous authors [31]. Its strong antimicrobial effect is attributed to its high phenolic compound content, including thymol and carvacrol, which constitute > 40% of this oil [32]. Kačániová et al. have previously shown that cinnamon EO was very effective against *B. subtilis*, where the MIC value was 0.10 mg/mL, similar to our results in the cases of all the tested bacteria [33]. In this case, cinnamaldehyde and eugenol, the major components of cinnamon EO, proved to be responsible for the antibacterial activity [34]. Similar to this recent work, the antibacterial role of one major EO component was demonstrated by our results using lemongrass EO and citral. We have also attributed the bactericidal effects to at least one other lemongrass EO component (α -terpineol). Further studies are required to clarify the roles of cadinene and calamenene. Altogether, the low inhibitory concentration (0.13 mg/mL) of lemongrass EO against a *Bacillus* species, *B. cereus* [35], was also in harmony with our findings on *B. thuringiensis*.

From among the most effective bactericidal EOs (thyme, cinnamon and lemongrass), lemongrass was chosen for further studies because of the following practical considerations: *B. thuringiensis*—a recently identified causative agent of PK—is a spore-forming bacterium. Although a recent study has shown that cinnamon, thyme, and lemongrass EOs were all able to reduce the number of viable spores, this effect was the most pronounced in the case of lemongrass EO [18,36]. Furthermore, cinnamon could cause contact dermatitis if exposed to the skin surface [37].

Percentage-based compound composition results, obtained by HS-SPME/GC-MS analysis, were in agreement with previous studies [38–40]. A former study has reported that West Indian lemongrass EO (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) contains about 77% citral. Natural citral is a mixture of two geometric isomers: geranial (citral a, ϵ - or α -citral) and neral (citral b, (Z)- or β -citral). In the case of West Indian lemongrass EO, their percentage distribution is usually as follows: geranial 36.7–55.9% and neral 25.0–35.2% [41]. Similarly, our results showed that neral comprised 26.1% and geranial comprised 34.5% of the EO. Generally, some discrepancies among EO compound compositions in publications are apparent due to multiple factors, including geographic localization and temperature [42,43].

It was not surprising that citral showed a characteristic inhibition zone (white spots on Figures 5 and 6) on the TLC-based bioautographic silica plate as this feature has been previously published in the cases of other bacterium species [44]. Our results further support that lemongrass EO is effective against hitherto uncharacterized bacterium species, including the potential aetiological agents of PK. Beyond citral, α -terpineol also induced antibacterial effects. In order to reveal other potential compounds with antibacterial features in lemongrass EO, HS-SPME/GC-MS analysis was used. The SPME method is an anhydrous sampling technique that involves the use of a fibre-coated extraction phase. In contrast to steam distillation, this technique works at a lower temperature, meaning that the compounds do not decompose or transform, and the proportion of more volatile components increases compared to the less volatile components [45]. Unfortunately, in the frame of this study we could not identify if γ -cadinene and calamenene were antibacterial as these compounds were not available from any supplier. We could only speculate if these EO compounds could also contribute to the antibacterial feature represented by a white spot on the TLC plate (Figures 5C(4),D(4) and 6C(4)) or not. Further studies addressing this issue in the future could clarify this question.

The low MIC and MBC values (0.1 mg/mL) of all three tested bacteria (Table 4) confirmed the strong antibacterial activity of citral, similar to recent findings [35] using *B. cereus* (0.15 mg/mL). Although the antibacterial feature of α -terpineol was less pronounced (Tables 3 and 4), results from the drop plate method, MIC and MBC tests indicate that this compound—together with cadinene and calamenene—might also contribute to the antibacterial feature of the spot that was analysed by HS-SPME/GC-MS.

Our results highlight the potential of therapeutics based on West Indian lemongrass EO in the treatment of PK and possibly other superficial skin infections, and revealed the presence of specific compounds with potential therapeutic value.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterium Isolates and Growth Conditions

Bacillus thuringiensis was isolated from the PK lesions of a 43-year-old man that presented with a prolonged history of malodour and burning irritation of his soles [8]. *Kytophoccus sedentarius* (DSM 20547) and *Dermatophilus congolensis* (DSM 44180) were purchased from the German Strain collection (Leibniz Institute, Braunschweig, Germany). All bacteria were routinely grown under aerobic conditions. Tryptic soy agar (TSA) (Oxoid, New York, NY, USA) was used to grow *B. thuringiensis* (37 °C) while blood agar (BA) was used for *D. congolensis* (37 °C) and *K. sedentarius* (30 °C). Tryptic soy broth (TSB) (Oxoid, New York, NY, USA) was used for the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) determinations.

4.2. Essential Oils

Twelve EOs (rosemary (*Rosmarinus officinalis*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), clove (*Eugenia caryophyllata*), salvia (*Salvia sclarea*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), citronella (*Cymbopogon nardus*), eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), fennel (*Foeniculum vulgare*), spearmint (*Mentha spicata*), peppermint (*Mentha piperita*), lemon (*Citrus limon*), and thyme (*Thymus vulgaris*)) were tested for their antibacterial effects on the bacterium species. The EOs were directly purchased from the Aromax Co. (Budapest, Hungary).

4.3. Antibacterial Testing—Drop Plate Method

The antibacterial effects of the EOs were examined on agar plates by the drop plate method. Prior to the experiments, bacterial cell counts were standardized by setting their optical densities (OD) at 600 nm (OD₆₀₀) to 0.2 (~10⁸ CFU/mL) in PBS. The suspension of *B. thuringiensis* (100 μ L) was spread on TSA plates, and 100 μ L from *K. sedentarius* and *D. congolensis* was spread on BA plates. After drying, 5 μ L of each EO was dropped onto the plate surfaces. The TSA plates were incubated at 37 °C for 24 h and the BA plates with *K. sedentarius* were incubated at 30 °C for 24 h. The following day, the diameters of inhibitions were measured in mm.

The same procedure was applied for the drop plate method of citral and α -terpineol. For controls, the antibiotics erythromycin and clindamycin were used.

4.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The MIC is defined as the minimum concentration of a drug that prevents visible growth of bacterium, while MBC is defined as the minimum drug concentration that reduces the growth (population) of microbial colonies by at least 99.9% [46]. The MICs and MBCs were determined by macrodilution tests. Bacterium isolates were grown and adjusted to OD₆₀₀ = 0.2 [46]. Serial dilutions were carried out in 5–5 mL of TSB medium. To these volumes, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 and 32 μ L of EO extracts were added to obtain concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 and 6.4 mg/mL, respectively. The bacterium suspensions (5 μ L) were added to the reagent tubes. Control tubes either did not contain bacteria (EO control) or did not contain bacteria and EOs (medium control). All tubes were incubated at 37 °C except *K. sedentarius* (30 °C). Inhibitory and bactericidal effects were determined the next day by running off 10 μ L suspensions on TSA plates for *B. thuringiensis*, and after 3 days

of incubation on BA plates for *D. congolensis* and *K. sedentarius* from visually clear reagent tubes.

The same procedure was applied for the MIC and MBC determinations of citral and α -terpineol by diluting the pure compounds from 12.8 mg/mL to 0.1 mg/mL. For controls, the antibiotics erythromycin and clindamycin were used.

4.5. Spore-Formation Inhibition Test

The ability of EOs to impede sporulation was examined using overnight cultures of *Bacillus thuringiensis*. This culture was diluted 1000 times and left to grow for 3 h (37 °C) to facilitate spore germination. From this culture the CFU was determined, and 5 μ L suspensions were added to the test tubes containing 5 mL of TSB medium, followed by different quantities (0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 16, 32, 64, 128 and 256 μ L) of lemongrass essential oil. The final solutions had concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.5, 25 and 50 mg/mL, respectively. After 24 h of incubation at 37 °C, 1–1 mL from the optically clear tubes was transferred to flasks containing 25 mL of sterile TSB medium. After 48 h of incubation at 37 °C, 10 μ L was plated on TSA plates to detect living bacteria. The absence of colonies was considered a clear indication that no sporulation has occurred and that survival of *B. thuringiensis* was hindered. Experiments were repeated 3 times.

4.6. Headspace Solid-Phase Microextraction (SPME) Conditions

The lemongrass EO sample and the white spots from the developed TLC-based bioautography plates were analysed with HS-SPME. In the case of lemongrass EO the liquid EO was analysed, while in the case of the TLC spot the cut-out silica plate was the analysed sample. The samples were put into vials (20 mL) and sealed with a silicon/PTFE septum prior to HS-SPME/GC-MS analysis. Sample preparation using the static headspace solid-phase microextraction (sHS-SPME) technique was carried out with a CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) automatic multipurpose sampler using a 65 μ M StableFlex carboxen/polydimethylsiloxane/divinylbenzene (CAR/PDMS/DVB) SPME fibre (Supelco, Bellefonte, PA, USA). After an incubation period of 5 min at 100 °C, extraction was performed by exposing the fibre to the headspace of a 20 mL vial containing the sample for 10 min at 100 °C. The fibre was then immediately transferred to the injector port of the GC/MS and desorbed for 1 min at 250 °C. Injections were made in splitless mode. The SPME fibre was cleaned and conditioned in a fibre bakeout station in a pure nitrogen atmosphere at 250 °C for 15 min.

4.7. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis

The analyses were carried out with an Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) system equipped with a Supelco (Sigma-Aldrich, Philadelphia, PA, USA) SLB-5MS capillary column (30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m). The GC oven temperature was programmed to increase from 60 °C (3 min isothermal) to 250 °C at 8 °C/min (1 min isothermal). High purity helium (6.0) was used as a carrier gas at 1.0 mL/min (37 cm/s) in constant flow mode. The mass selective detector (MSD) was equipped with a quadrupole mass analyser and was operated in electron ionization mode at 70 eV in full scan mode (41–500 amu at 3.2 scan/s). The data were evaluated using MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The identification of the compounds was carried out by comparing retention data and recorded spectra with the literary data, and the NIST 2.0 library was also consulted. The percentage evaluation was carried out by area normalization.

4.8. Thin-Layer Chromatography Combined with Direct Bioautography (TLC-DB)

The overall composition and specific antibacterial compounds of lemongrass EO were visualized in parallel on two preconditioned (100 °C for 30 min) 5 \times 10 cm 60 F₂₅₄ TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany) as described previously [47], with slight modifications. Aliquots (0.2 μ L) were deposited in a horizontal thin line at the bottom of the the plates,

and ethanol served as a solvent control. Citral (20 mg/mL; Sigma Technology Hungary, Budapest, Hungary) and α -terpineol (100 mg/mL; Sigma Technology Hungary) were used with known running features. The TLC plates were developed with toluene–ethyl acetate (97:3) in a saturated twin trough chamber (CAMAG, Muttenz, Switzerland). The plate was incubated (at room temperature, 1 h) in 50 mL of TSB in the case of *D. congolensis* and for 10 s in the cases of the *B. thuringiensis* and *K. sedentarius* suspensions (3×10^8 cfu mL⁻¹). Then, the plates were incubated in a vapour chamber at 37 °C for 2 h (*B. thuringiensis*) or 6 h (*D. congolensis* at 37 °C and *K. sedentarius* at 30 °C). The following day the plates were immersed in an aqueous solution of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 0.05 g/90 mL) for 10 s and incubated under aerobic conditions in a vapour chamber (*B. thuringiensis* and *D. congolensis* at 37 °C, *K. sedentarius* at 30 °C) until the white spots appeared. The antibacterial activities of the separated compounds were indicated by the presence of these white spots against the bluish background [47]. All measurements were performed in duplicate. Separated compounds of lemongrass EO were visualized by dipping one TLC plate into the ethanolic vanillin–sulphuric acid reagent and heated for 5 min at 90 °C. The separated components were characterized according to Rf values, determined by the known standards (citral, α -terpineol) and Kovats index. The definition of the Rf value is the distance travelled by a given component divided by the distance travelled by the solvent front. For a given system at a known temperature, it is a characteristic of the component and helps to identify components [48]. The Kovats retention index is a concept introduced in GC to convert retention time into a more reliable and reproducible system [49].

5. Conclusions

The antimicrobial effects of 12 essential oils were confirmed on a group of bacteria responsible for the superficial skin infection pitted keratolysis. Lemongrass proved to be the most effective EO as it was most able to actively inhibit spore formation. From among the compounds, the antibacterial effect of citral was confirmed on all the known aetiological agents, and α -terpineol was revealed to possess a similar effect. Results of this study have demonstrated the potential of therapeutics containing lemongrass EO in the treatment of PK.

Author Contributions: Conceptualization, G.S. and B.S.; methodology, V.L.B.; software, T.P.; validation, V.L.B., S.M., B.S.-T. and A.B.; investigation, S.M, B.S.-T. and A.B.; resources, G.S.; data curation, T.P.; writing—original draft preparation, B.S.; writing—review and editing, G.S.; visualization, B.S. and V.L.B.; supervision, G.H.; project administration, G.S.; funding acquisition, G.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not relevant.

Informed Consent Statement: Not relevant.

Data Availability Statement: Not applicable.

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

Sample Availability: All samples were bought from official suppliers as described.

References

1. Singh, G.; Naik, C.L. Pitted keratolysis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol* **2005**, *71*, 213–215. [[CrossRef](#)]
2. Kaptanoglu, A.F.; Yuksel, O.; Ozyurt, S. Plantar pitted keratolysis: A study from non-risk groups. *Dermatol. Rep.* **2012**, *4*, e4. [[CrossRef](#)]
3. Stollsteiner, S.; Chung, S.; Laganier, J.; Tan, A.; Brun, C.; Ducasse, V.; Teixeira, A. A story of hands and smelly feet. *Eur. Geriatr. Med.* **2016**, *7*, 100–101. [[CrossRef](#)]
4. Dhitavat, J.; Bussaratid, V.; Choovichian, V.; Tunyong, W.; Chanket, P. Pitted keratolysis during flooding in Thailand. *Int. J. Infect. Dis.* **2012**, *16*, e217. [[CrossRef](#)]
5. Leung, A.K.C.; Barankin, B. Pitted Keratolysis. *J. Pediatr.* **2015**, *167*, 1165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Nordstrom, K.M.; McGinley, K.J.; Cappiello, L.; Zechman, J.M.; Leyden, J.J. Pitted keratolysis: The role of *Micrococcus sedentarius*. *Arch. Dermatol.* **1987**, *123*, 1320–1325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Woodgyer, A.J.; Baxter, M.; Rush-Munro, F.M.; Brown, J.; Kaplan, W. Isolation of *Dermatophilus congolensis* from two New Zealand cases of pitted keratolysis. *Aust. J. Dermatol.* **1985**, *26*, 29–35. [[CrossRef](#)]
8. Schneider, G.; Schweitzer, B.; Kovács, T. *Bacillus thuringiensis*: A causative agent of pitted keratolysis. *Aust. J. Dermatol.* **2021**, *62*, e609–e611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Zaias, N. Pitted and ringed keratolysis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1982**, *7*, 787–791. [[CrossRef](#)]
10. Vasireddy, L.; Bingle, L.E.H.; Davies, M.S. Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201835. [[CrossRef](#)]
11. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Naik, M.I.; Fomda, B.A.; Jaykumar, E.; Bhat, J.A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2010**, *3*, 535–538. [[CrossRef](#)]
13. Edward, M.J. *American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook*; McGuffin, M., Hobbs, C., Upton, R., Goldberg, A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1997.
14. Shigeharu, I.; Toshio, T.; Hideyo, Y. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 565–573.
15. Pereira, R.S.; Sumita, T.C.; Furlan, M.R.; Jorge, A.O.C.; Ueno, M. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infections. *Rev. Saude Publ.* **2004**, *38*, 326–328. [[CrossRef](#)]
16. Schaneberg, B.T.; Khan, I.A. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemongrass by GC. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1345–1349. [[CrossRef](#)]
17. Pino, J.A.; Fon-Fay, F.M.; Pérez, J.C.; Falco, A.S.; Rodríguez, J.L.; Hernández, I.; Rodeiro, I.; Fernández, M.D. Chemical composition and biological activities of essential oil from lemongrass (*Cymbopogon citratus* [D.C.] Stapf.) leaves grown in Amazonian Ecuador. *Rev. CENIC Cienc. Quím.* **2018**, *49*, 1–8.
18. Lawrence, H.A.; Palombo, E.A. Activity of essential oils against *Bacillus subtilis* spores. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *19*, 1590–1595. [[CrossRef](#)]
19. Garneau, J.R.; Valiquette, L.; Fortier, L.C. Prevention of *Clostridium difficile* spore formation by sub-inhibitory concentrations of tigecycline and piperacillin/tazobactam. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Shukr, M.H.; Metwally, G.F. Evaluation of topical gel bases formulated with various essential oils for antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trop. J. Pharm. Res* **2013**, *12*, 877–884. [[CrossRef](#)]
21. Moore-Neibel, K.; Gerber, C.; Patel, J.; Friedman, M.; Ravishankar, S. Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *112*, 485–492. [[CrossRef](#)]
22. Berthold Pluta, A.; Stasiak Różańska, L.; Pluta, A.; Garbowska, M. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 1137–1147. [[CrossRef](#)]
23. Oulkheir, S.; Aghrouch, M.; El Mourabit, F.; Dalha, F.; Graich, H.; Amouch, F.; Ouzaid, K.; Moukale, A.; Chadli, S. Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram positive pathogenic bacteria. *J. Dis. Med. Plants* **2017**, *3*, 1–5.
24. Cui, H.; Zhang, X.; Zhou, H.; Zhao, C.; Lin, L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Bot. Stud.* **2015**, *56*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shahbazi, Y. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. *J. Pathog.* **2015**, *2015*, 916305. [[CrossRef](#)]
26. Al Zuhairi, J.J.M.J.; Kashi, F.J.; Rahimi-Moghaddam, A.; Yazdani, M. Antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against bacteria isolated from urinary tract infection. *Eur. J. Integr. Med.* **2020**, *38*, 101192. [[CrossRef](#)]
27. Timung, R.; Barik, C.R.; Purohit, S.; Goud, V.V. Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study. *Ind. Crops. Prod.* **2016**, *94*, 178–188. [[CrossRef](#)]
28. Thosar, N.; Basak, S.; Bahadure, R.N.; Rajurkar, M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. *Eur. J. Dent.* **2013**, *7*, 71–77. [[CrossRef](#)]
29. Soetjijpto, H. Antibacterial properties of essential oil in some Indonesian herbs. In *Potential of Essential Oils*; El-Shemyn, H.A., Ed.; IntechOpen: Salatiga, Indonesia, 2018; Volume 3, pp. 41–58.
30. Damjanović-Vratnica, B.; Đakov, T.; Šuković, D.; Damjanović, J. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech J. Food Sci.* **2011**, *29*, 277–284. [[CrossRef](#)]
31. Messaoudi, M.; Benreguieg, M.; Merah, M.; Messaoudi, Z.A. Antibacterial effects of *Thymus algeriensis* extracts on some pathogenic bacteria. *Acta Sci. Biol. Sci.* **2019**, *41*, e48548. [[CrossRef](#)]
32. Sienkiewicz, M.; Lysakowska, M.; Denys, P.; Kowalczyk, E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb. Drug Resist* **2012**, *18*, 137–148. [[CrossRef](#)]
33. Kačániová, M.; Galovičová, L.; Valková, V.; Tvrdá, E.; Terentjeva, M.; Žiarovská, J.; Kunová, S.; Savitskaya, T.; Grinshpan, D.; Štefániková, J.; et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Cinnamomum cassia* essential oil and its application in food preservation. *Open Chem.* **2021**, *19*, 214–227. [[CrossRef](#)]

34. Gende, L.B.; Floris, I.; Fritz, R.; Eguaras, M.J. Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina. *Bull. Insectol.* **2008**, *61*, 1–4.
35. Aiensaard, J.; Aiumlamai, S.; Aromdee, C.; Taweechaisupapong, S.; Khunkitti, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res. Vet. Sci.* **2011**, *91*, e31–e37. [[CrossRef](#)]
36. Salem, A.M.; Mohamed, E.F.; Selim, E.M. Antimicrobial effect of some natural oils on *Bacillus cereus* in minced beef. *BVMJ* **2018**, *34*, 149–156. [[CrossRef](#)]
37. Calnan, C.D. Cinnamon dermatitis from an ointment. *Contact Derm.* **1976**, *2*, 167–170. [[CrossRef](#)]
38. Lee, J.E.; Seo, S.M.; Huh, M.J.; Lee, S.C.; Park, I.K. Reactive oxygen species mediated-antifungal activity of cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oils and their constituents against two phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2020**, *168*, 104644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hanaa, A.R.M.; Sallam, Y.I.; El-Leithy, A.S.; Aly, S.E. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Ann. Agric. Sci.* **2012**, *57*, 113–116. [[CrossRef](#)]
40. Al Naqqash, Z.A.; Al-Bazaz, H.K.; Salh, F.M.; Ibraheem, S.Q. GC-Mass and phytochemical investigation of *Cymbopogon citratus*. *Res. J. Pharm. Technol.* **2019**, *12*, 67–73. [[CrossRef](#)]
41. Tisserand, R.; Young, R. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*, 2nd ed.; Churchill Livingstone Elsevier: Edinburgh, UK, 2014.
42. Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N.; Mnif, W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *MDPI Med.* **2016**, *3*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Barra, A. Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1147–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Falcao, M.A.; Fianco, A.L.B.; Lucas, A.M.L.; Pereira, M.A.A.; Torres, F.C.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E. Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. *Phytochem. Rev.* **2012**, *11*, 405–412. [[CrossRef](#)]
45. An, M.; Haig, T.; Hatfield, P. On-site field sampling and analysis of fragrance from living Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) flowers by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2001**, *917*, 245–250. [[CrossRef](#)]
46. CLSI. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline*; CLSI document M26-A; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 1999.
47. Kovács, J.K.; Felső, P.; Horváth, G.; Schmidt, J.; Dorn, Á.; Ábrahám, H.; Cox, A.; Márk, L.; Emődy, L.; Kovács, T.; et al. Stress response and virulence potential modulating effect of peppermint essential oil in *Campylobacter jejuni*. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2019*, 2971741.
48. Daintith, J. *Dictionary of Chemistry*, 6th ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2008.
49. Idroes, R.; Japnur, A.F.; Suhendra, R.; Rusyana, A. Kovats Retention Index analysis of flavor and fragrance compound using Biplot Statistical method in gas chromatography systems. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2019**, *523*, 012007. [[CrossRef](#)]