

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem

SAPIENTIA EMTE - CSÍKSZEREDAI KAR

TDK dolgozat

**A kökény és a homoktövis rügykivonatok antimikrobiális
hatásának vizsgálata**

Szerző: Ungvári Boróka - Élelmiszeripari mérnök BSc III. év

Témavezetők:

Dr. György Éva, egyetemi professzor, tanszékvezető

*Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar, Élelmiszertudományi
Tanszék, Csíkszereda, E-mail: gyorgyeva@uni.sapientia.ro*

Héjja Melinda, doktorandusz hallgató

*Debreceni Egyetem, Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola, Táplálkozás-
tudományi Intézet, E-mail: hejja.melinda@agr.unideb.hu*

Csíkszereda

2024. április 26-27.

Kivonat

Az élelmiszeripar számára nagy kihívást jelent a patogén mikroorganizmusokkal szembeni küzdelem, illetve az általuk előidézett megbetegedések megelőzése. A különböző növényi eredetű anyagok mikrobiellenes hatása ismert, és az élelmiszeripar igyekszik előtérbe helyezni és felhasználni a természetes antimikrobiális anyagokat. A leginkább tanulmányozott növényi részek az illóolajok, viszont manapság egyre jobban a figyelem középpontjába kerülnek a rügyek, ugyanis a másodlagos metabolitok mellett egyéb értékes komponensek is megtalálhatók bennük, mint a hormonok, citokinek, nyomelemek és enzimek.

A kutatás során a kökény (*Prunus spinosa* L.), illetve a homoktövis (*Hippophae rhamnoides* L.) rügykivonatok antibakteriális hatását vizsgáltam három Gram-pozitív (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), és két Gram-negatív (*Salmonella enterica* és *Escherichia coli*) baktériumra agar diffúziós- és táplevesben történő tenyésztési módszerrel. Az összefüggések jobb megértése érdekében a rügykivonatok összes polifenol tartalmát is meghatároztam Folin Ciocâlțeu módszerrel.

A vizsgált rügykivonatokra leginkább a *Bacillus cereus* és *Staphylococcus aureus* baktériumok voltak érzékenyek úgy az agar diffúziós-, mint a táplevesben történő tenyésztési eljárás során. Leginkább ellenálló mikrobának az agar diffúziós módszer esetében a *S. enterica* és az *E. coli* bizonyult, ugyanis még a 100%-os kivonat sem hozott létre gátlási zónát, míg a tápleves esetében a *B. cereus* és az *E. coli* mutatott jelentős ellenállást. A két extraktum közül a homoktövis erősebbnek bizonyult, mint a kökény kivonat, mivel az alacsonyabb koncentrációk (20-30%) is bakteriosztatikus hatást hoztak létre. Ez összefüggésbe hozható azzal, hogy a homoktövis rügykivonatnak magasabb a polifenol tartalma.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Célkitűzések	5
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1 A patogén mikroorganizmusok jelentősége az élelmiszeriparban	5
3.2 Antimikrobiális anyagok jellemzése	7
3.3 A kökény jellemzése.....	8
3.4 A homoktövis jellemzése.....	9
3.5 Rügykivonatok jótékony hatásai	11
4. Anyagok és módszerek	12
4.1 A kutatásban használt anyagok és berendezések.....	12
4.2 A kutatásban alkalmazott módszerek	12
4.2.1 A rügykivonatok előállítása	12
4.2.2 Agar diffúziós módszer	13
4.2.3 Táplevesben történő tenyésztési eljárás	14
4.2.4 TPC módszer Folin Ciocâlteu reagenssel.....	16
4.2.5. Statisztikai vizsgálatok	17
5. Eredmények és kiértékelésük.....	17
5.1. Az agar diffúziós módszer eredményei	17
5.2. A táplevesben történő tenyésztési módszer eredményei	19
5.3. A TPC módszer eredményei.....	22
6. Következtetések	24
7. Összefoglalás	24
8. Köszönetnyilvánítás	25
9. Irodalomjegyzék	26

1. Bevezetés

Az élelmiszeripar számára nagy kihívás a patogén baktériumok elleni küzdelem. Ezzel társul a fogyasztók által felállított elvárások az élelmiszeriparral szemben, melyek időről időre változnak. Mivel egyre több figyelmet szentel az orvostudomány a táplálkozási szokások és a táplálékok hosszútávú következményeire, így napjainkban általános követelmény a társadalom részéről, hogy az élelmiszerek minél kevésbé legyenek feldolgozva és lehetőleg ne, vagy csak nagyon kis mennyiségben tartalmazzanak mesterséges adalékanyagokat és tartósítószerket. Ezen kitételek teljesítéséhez járulnak hozzá a természetes, vagy természetes alapú tartósítószerke, illetve antimikrobiális hatással rendelkező anyagok [1].

A természetben számos antimikrobiális anyag fellelhető állatokban, növényekben és mikroorganizmusokban is, és ezen anyagok iránt egyre nagyobb az érdeklődés úgy a társadalom, mint az ipar által. Ezek közül van, amit már felhasználnak az élelmiszerek gyártásánál, például a tejben található laktoperoxidáz, a fokhagymában található allicint vagy a tejsavbaktériumok által termelt nizin. Ezekhez legtöbb esetben társulnak különböző szinergiák, például alacsony pH és vízaktivitás, oxigén elvonás, magas nyomás vagy hőmérséklet szabályozás [2].

Kutatások alapján több mint 1340 növény ismeretes, melyek antimikrobiális hatóanyagokkal rendelkeznek, például fenolos vegyületekkel (melyek gombaölő szerként hatékonyak), szerves savakkal vagy illóolajokkal [3]. Azon növények, melyek tartalmazzák ezen hatóanyagokat már széles körben elterjedtek az élelmiszeriparban, ilyen például a rozmaryn, a koriander, a hagyma vagy a fokhagyma [4].

A növényekben található antimikrobiális anyagok szerepe elsősorban a növények védelmére szolgál a különböző mikroorganizmusokkal szemben, viszont ezek potenciális védő szerepet nyújthatnak, úgy az emberi szervezetnek, mint az élelmiszereinknek. Nem véletlen tehát, hogy évszázadok óta használatosak ezen növények, a gyógyszer-, szépség- és élelmiszeriparban [5]. Habár eddig az illóolajok voltak népszerűek, most már egyre több figyelmet kapnak a rügyek is, melyek nem csak antimikrobiális, hanem más értékes hatóanyagokkal is rendelkeznek, például citokinekkal, nyomelemekkel és hormonokkal is. Ezen anyagok együttesen, egy olyan komplexet képeznek, mely az emberi szervezetre nézve különösen jótékony amellet, hogy a társadalmi elvárásnak is megfelel, miszerint a természetes anyagokat kell előnyben részesíteni a szintetikusak helyett.

2. Célkitűzések

Kutatásom célja elsősorban az volt, hogy feltárjam a homoktövis és a kökény antimikrobiális tulajdonságait, illetve, hogy számszerűsítsem ezek hatékonyságát. Ezen felül az össz-polifenol tartalom meghatározásával további összefüggések meghatározása volt a cél.

A homoktövis, illetve kökény extraktumok emberi fogyasztásra alkalmasak, így bizonyítva alkalmasságukat felhasználhatók az élelmiszeriparban, természetes adalékanyagokként.



1. ábra: A kutatás célkitűzései

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A patogén mikroorganizmusok jelentősége az élelmiszeriparban

Az élelmiszeriparban kiemelkedően fontos témakör a patogén mikroorganizmusok, mivel ezek nagy veszélyt jelentenek a fogyasztók egészségére. Patogén mikroorganizmusok lehetnek baktériumok, gombák vagy vírusok, melyek emésztőrendszeri zavarokat vagy súlyosabb esetekben halált okozhatnak [6]. Egy felmérés alapján évente 7,7 millió ember hal

meg valamilyen baktérium által okozott fertőzés miatt, melyeknek nagy részét a *Staphylococcus aureus* és *Eserichia coli* baktériumok okozzák [7]. Ezen baktériumok viszont gyakran fellelhetőek élelmiszerekben, viszont mennyiségüket EU-s jogszabályok is korlátozzák [8] (1. táblázat).

1. táblázat: A kutatásban vizsgált mikroorganizmusok határértékei Európai Unió jogszabályok alapján

Mikroorganizmus	Típus	Határérték (TKE/g)
<i>Bacillus cereus</i>	Gram-pozitív	<100
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram-pozitív	<100
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-pozitív	<100
<i>Salmonella enterica</i>	Gram-negatív	Nem kimutatható 25 g-ban
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negatív	<10

A patogén mikroorganizmusok elleni első lépés a gyártási folyamatok alatt betartott jó higiéniai gyakorlat, viszont ez nem elégséges a teljes védelemhez, így szükségessé válik a különböző technológiák használata, mint például a hőkezelés, illetve az antimikrobiális anyagok használata.

A *Bacillus cereus* kétféle típusú megbetegedést válthat ki az emberekben: az első típus hányással jár, melyet emetikus toxinok váltanak ki. A második típust enterotoxinok okozzák, ez pedig hasmenést eredményez [22]. A *Bacillus* fajok több antibiotikummal szemben is rezisztensek, ami nagyon megnehezíti az általuk okozott megbetegedések kezelését [29].

A *Listeria monocytogenes* különösen veszélyes lehet a gyerekekre, idősekre, várandósokra és immungyenge személyekre nézve, viszont az egészséges ember szervezetét is képes fertőzni. Enyhébb esetekben a betegség lázzal, hányingerrel, hasmenéssel és izomfájdalmakkal jár. Komolyabb esetekben, vagy a YOPI (Young, Old, Pregnant, Immune compromised – Gyerekek, Idősek, Várandósok, Immungyenge egyének) csoportba tartozó egyéneknél a fertőzés áterjedhet a gerincvelőre, esetlegesen az agyra is [23]. A *Listeria monocytogenes* baktérium által okozott betegség neve liszteriózis, amit elsősorban antibiotikumokkal kezeltek, viszont így ez a mikroorganizmus elkezdett antibiotikum rezisztenciát kialakítani [28].

A *Staphylococcus aureus* élelmiszer mérgezést válthat ki, az általa termelt enterotoxinok miatt. A *Staphylococcus aureus* által kiváltott megbetegedés hányással és hasmenéssel jár [24]. Emellett a *Staphylococcus aureus* baktérium hírhedt az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájáról, illetve erősen gyógyszerrezisztens [27].

A *Salmonella enterica* a szalmonellózis nevű megbetegedésért felelős, melynek tünetei közé tartozik a láz, a hasi görcsök és a hasmenés is. Annak ellenére, hogy az emberek többsége magától felépül a szalmonellózisból, súlyosabb esetekben orvosi segítség is szükséges a teljes gyógyuláshoz [25]. A *Salmonella enterica* szintén egy antibiotikum rezisztens baktérium. Először az 1960-as években jelent meg a baktérium ellenállása, nevezetesen a kloramfenikol nevű antibiotikummal szemben, viszont azóta csak növekedett az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája a *Salmonella* törzseknek [30].

Az *Escherichia coli* az egyik legismertebb baktérium. Az állati, illetve emberi emésztőrendszerben is megtalálható, azonban az emésztőrendszeren kívüli területekre jutva súlyos bélfertőzéseket okozhat, melyek heveny hasmenéssel és hasi görcsökkel járhat, amihez esetenként láz is társul [26]. Az *Escherichia coli* törzsei az előzőekhez hasonlóan képesek antibiotikum rezisztenciát kialakítani, aminek oka általában a túlzott antibiotikum használat [31].

3.2 Antimikrobiális anyagok jellemzése

Azokat a vegyületeket, melyek képesek elpusztítani, vagy gátolni a mikroorganizmusok szaporodását antimikrobiális anyagoknak nevezzük. Ezek a vegyületek származásuk alapján lehetnek természetesek, illetve mesterségesek, továbbá a természetesek lehetnek, állati-, növényi- vagy mikrobiológiai eredetűek, a mesterségesek pedig lehetnek antibiotikumok vagy szintetikus vegyületek (2. táblázat) [9].

2. táblázat: Antimikrobiális anyagok osztályozása

Antimikrobiális anyagok	Osztályozás	Példa
Természetes antimikrobiális anyagok	Növényi eredetű	Kurkumin
	Állati eredetű	Méhviasz
	Mikrobiális eredetű	Nizin
Szintetikus antimikrobiális anyagok	Antibiotikumok	Ciprofloxacín
	Szintetikus vegyületek	Klórhexidin

A növényekben található antimikrobiális anyagok, lehetnek szerves vegyületek, így például szaponinok, fenolok vagy flavonoidok. Ezek gyakran polárosak, mely tulajdonságuk által könnyen kölcsönhatásba léphetnek a vízben oldott mikroorganizmusokkal. Egy másik nagyon fontos fizikai-kémiai tulajdonságuk, hogy általában kristályos szerkezettel rendelkeznek, ami segítséget nyújt a jelenlévő patogén mikroorganizmusok sejtmembránjainak a károsításában. Továbbá a növényi eredetű antimikrobiális anyagok

változó pH-tartományban is igencsak stabilak, tehát más-más környezeti feltételek mellett is hatékonyak lehetnek [10].

A növényi antimikrobiális anyagok hatásmechanizmusa többféle lehet. A fenolok és fenolsavak a mikroorganizmusok sejtmembránját károsítják, azáltal, hogy megváltoztatják annak integritását, pontosabban a membrán lipidekkel lépnek kölcsönhatásba, így megzavarják a struktúráját, illetve permeabilitását. A szaponinok pedig a mikroorganizmusok sejtfalának a szintézisét képesek gátolni. Más antimikrobiális anyagok a mikroorganizmusok enzimatis aktivitását tudják befolyásolni, ami a DNS- replikáció gátlásához vezet. Egyes növényi alkotók, melyek antioxidánsokat tartalmaznak (például karotinoidok), képesek az oxidatív stresszt kiváltani mikroorganizmusokból, amely sejthalált okoz [11].

Fontos megjegyezni, hogy az egyes növényekben jelenlévő vegyületek, egyszerre több hatásmechanizmussal is képesek működni, továbbá, hogy az antimikrobiális hatás szorosan összefügg a gátolni vagy elpusztítani kívánt mikroorganizmus tulajdonságaival, védekező képességével, és a növényben található hatóanyagok koncentrációjával.

3.3 A kökény jellemzése

A kökény (*Prunus spinosa* L.) (2. ábra) a rózsafélék családjába tartozó, tövises cserje, a szilva egyik közeli rokona. Ennek az Európában is őshonos növénynek a termése kékesfekete színű, apró és csonthéjas [12].



2. ábra: A kökény (*Prunus spinosa*)

A kökényt számos iparágban felhasználják, hiszen egy értékes növény. A gasztronómiában termését felhasználják dzsemek, gyümölcsborok és likőrök készítéséhez, leveléből teát főznek. A gyógyászatban is alkalmazzák, hiszen virágzata teaként hashajtó

hatású, ezzel szemben a terméséből főzött lekvár hasfogó. Alkalmas még a diabétesz, hörghurut külső gyulladások kezelésére is, illetve veseproblémákra is javasolják [38]. Továbbá a népi gyógyászatban vérnyomáscsökkentőként ismeretes. Ezen felül a növényt, mint díszcserjét is használják, illetve faanyaga nagyon kemény, nehezen törik, ebből adódóan pedig asztalos munkákhoz is kiváló [13].

Az élelmiszeriparban már tesztelték adalékanyagként a kökény gyümölcsét, és bebizonyították, hogy darálva javítja a fagylalt minőségét, táplálkozási-, érzékszervi- és fizikai-kémiai értékét. Joghurt készítésnél természetes színezékként és édesítőszerként használták, valamint diétás rostforrásként is kiváló [43].

Tehát kijelenthetjük, hogy a kökény egy rendkívül hasznos és sokoldalú növény, kémiai összetétele és tulajdonságai (3. táblázat) is erről árulkodik, hiszen termése akár 12,1 mg/g C-vitamin-, 41,3 mg/g antocián- és 407 mg/g fenolsav tartalommal is rendelkezhet [14]. Ezen felül a kökény gyümölcsének prebiotikus hatásai is vannak, emiatt fogyasztása támogatja a bélflórát, és pozitív hatással van az emésztésre [38].

3. táblázat: A kökény gyümölcs kémiai tulajdonságai

Oldható szilárdanyag tartalom (%)	pH	Titrálható savasság (%)	C-vitamin tartalom (mg/100 ml)	Antocianidok (mg/100 g friss gyümölcs)	Fenolsav tartalom (mg galluszsav/100 g friss gyümölcs)	Antioxidáns aktivitás (%)
11,98-14,98	3,13-3,7	3,87-4,99	3,8-12,1	0,0-41,3	117-407	71,15-78,99

A kökény gyümölcsének antimikrobiális tulajdonságait már vizsgálták, és a kutatások azt mutatták, hogy a gyümölcs kivonata, már 0,25 mg/mL-es koncentrációban gátolta az *Escherichia coli*, a *Salmonella typhimurim*, az *Enterobacter aerogenes*, az *Enterococcus faecalis* és a *Staphylococcus aureus* baktériumokat. Ezen hatásért pedig valószínűleg a kivonatban található flavonoidok (myrcitin, kvercetin, rutin) és fenolsavak felelősek [32].

3.4 A homoktövis jellemzése

A homoktövis (*Hippophae rhamnoides* L.) (3. ábra) egy az ezüsfafélék családjába tartozó cserje. A mérsékeltsubtrópusi övezetben őshonos, Nepálból terjedt el. Ezen növény 2-6 m magasra nő, levelei lándzsa alakúak, termése sárga színű és a bogyók ovális alakúak [15].



3. ábra: *A homoktövis (Hippophae rhamnoides)*

A homoktövis felhasználási módjai igencsak széleskörűek, hiszen felhasználják a gyógyszer- és élelmiszeriparban is jótékony hatásai miatt, továbbá a talajerózió megelőzése érdekében is ültetik [16].

A homoktövis termése gazdag szénhidrátokban, fehérjékben, szerves savakban, illetve aminosavakban és vitaminokban (4. táblázat), így a tápértéke nagyon magas [17]. Ebből is következik, hogy a népi gyógyászatban is közkedvelt, ám a gyógyszeriparban is számos terméket előállítanak belőle. Bőrbetegségek, például pikkelysömör vagy ekcéma, szív- és érrendszeri betegségek vagy égési sérülések kezelésére is használják. Ezen felül alkalmas emésztőrendszeri zavarokra, gyulladások csökkentésére és a rákos megbetegedések kezelésére is [41]. A homoktövis olajat tengerimalacoknak adagolták, ez pedig csökkentette a beültetett daganatok tumorfejlődését. Ezen jótékony hatásai által a homoktövis olajat, már engedélyezték a kórházakban való felhasználásra Oroszországban, illetve Kínában.

Továbbá a szépségiparban is kedvelt növény, mivel kivonata csökkenti a hajhullást és serkenti a fejbőr vérkeringését [42].

4. táblázat: A homoktövis kémiai összetétele

Összetevő	Érték
Szerves sav	2,6-4%
Cukrok és alkoholok	3,5-7%
B1-vitamin	0,02-0,08 mg/100 g
B2-vitamin	0,03-0,056 mg/100 g
C-vitamin	150-1600 mg/100 g
Karotinoidok	6-28 mg/100 g
Folsav	0,79 mg/100 g
Flavonoidok	0,2-1,5%

A homoktövis magjainak antimikrobiális hatása már ismert. A homoktövis magok metanolos kivonata erős antimikrobiális hatást mutatott a *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus coagulans* és *Bacillus subtilis* baktériumokkal szemben. Ezzel ellentétben a mikrobagátló hatás jóval alacsonyabb volt a *Yersinia enterocolitica* baktérium esetében [33].

3.5 Rügykivonatok jótékony hatásai

A különböző növények jótékony hatásai az emberi szervezetre már évszázadok óta ismeretesek, nem véletlen, hogy a népi gyógyászatban számos növényt alkalmaznak különböző betegségek kezelésére.

Napjainkban már egyre nagyobb figyelmet kapnak a rügyek, illetve hajtások is, ami nem véletlen, hiszen a rügyekben, illetve hajtásokban számos az emberi szervezet számára hasznos anyag felgyülemlik. Ezen okból kifolyólag jelent meg a gemmoterápia is. A gemmoterápia egy olyan, viszonylag új terápiás módszer, mely különböző növények rügy és bimbó kivonatainak jótékony hatásain alapul.

A különböző rügyekből nyert extraktumok általában jóval magasabb mértékben tartalmaznak fenolokat, antioxidánsokat, vitaminokat és egyéb bioaktív anyagokat, mint a növények más részeiből nyert kivonatok. A rügykivonatok jótékony hatásai közé sorolhatjuk például a gyulladás- és stressz csökkentő hatást, az immunrendszer erősítést, illetve a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának megelőzését [34].

A rügykivonatok jótékony hatásaira egy egyszerű példa a rózsa rügykivonata, melyről bizonyították, hogy hatékonyan gátolja a *Staphylococcus aureus* baktériumot, és ezt alkalmazni lehet a sertéshús biztonságának fenntartásában [35]. Továbbá a sárga festővirág rügykivonatának hatásai az emberi szervezetre is egy nagyon jó szemléltetője a rügykivonatok

pozitív hatásainak. A sárga festővirág rügykivonata megelőzi az agy kognitív funkcióinak a csökkenését. Az extraktum javítja a tanulási képességeket, illetve a memóriát [36].

4. Anyagok és módszerek

4.1 A kutatásban használt anyagok és berendezések

A kutatás során a fő alapanyagok a kökény és homoktövis rügykivonatok voltak, amelyek a PlantExtrakt cégnél lettek előállítva 2023-ban. A rügyek a cég saját ültetvényéről voltak begyűjtve Kolozs megyéből.

A mikrobiológiai vizsgálatokhoz három Gram-pozitív (*Bacillus cereus* B.00076), *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* B.01055), és két Gram-negatív (*Salmonella enterica* sups. *enterica* B.00834, *Escherichia coli* B.00200) baktériumot használtam, amelyek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származtak Budapestről, továbbá Nutrient táplevest és Nutrient agart (VWR International, Debrecen) alkalmaztam, mint tápközeg. A polifenol tartalom meghatározáshoz TPTZ-t (2,4,6-trisz 2,3 (2-piridil)-s-triazin, $C_{18}H_{12}N_6$), nátrium karbonátot ($NaCO_3$), metanolt (CH_3OH), galluszsavat ($C_7H_6O_5$), Folin-Ciocalteu reagenst és desztillált vizet használtam.

A mérések megvalósításához szükségem volt UV/VIS spektrofotométerre (DR6000) (4. ábra), digitális tolmércére és laboratóriumi inkubátorra.



4. ábra: DR6000 UV/VIS spektrofotométer (forrás: saját kép)

4.2 A kutatásban alkalmazott módszerek

4.2.1 A rügykivonatok előállítása

A kivonatok előállítása az European Pharmacopoeia-ban leírt módszer alapján történt. A begyűjtött friss rügyek 1:1 arányú 96%-os (v/v) etanol és glicerin keverékében voltak

áztatva, úgy, hogy a száraz növényi anyag és oldószer aránya 1:20. Ezt követően a keverék 20 napig rázatva volt napi 2x20 percet, majd az idő lejártá után a szilárd és a folyadék fázis el lett választva, majd a szilárd részt préselésnek vetették alá, hogy a kihozatal növekedjen. A vizsgálatokhoz az etanol el lett párologtatva rotavapor berendezés segítségével 40 °C-on és 200 mbar-on, elkerülve ezáltal, hogy a bioaktív komponensek károsodjanak. Az elpárologtatott etanol azonnal desztillált vízzel lett helyettesítve és a kivonat felhasználásig 4 °C-on volt tárolva (5. ábra).

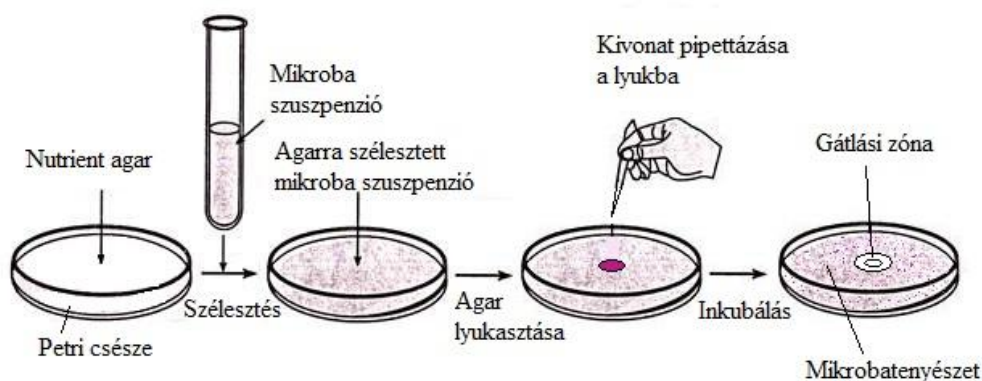


5. ábra: Homoktövis (A) és kökény (B) rügykivonatok

4.2.2 Agar diffúziós módszer

Az agar diffúziós módszer egy olyan vizsgálat melynek segítségével számszerűsíthető a különböző mikroba gátló anyagok hatékonysága.

A vizsgálat során a baktériumokból fiziológiás sóoldatban 1-es optikai sűrűségű szuszpenziót készítettem, majd 0,1 mL mennyiséget (kb. 10^8 TKE/mL) Nutrient agarra szélesztettem és a közepébe 8 mm átmérőjű lyukat vágtam, amelybe 0,1 mL, különböző koncentrációjú kivonatokat pipettáztam (10-100%, ahol a 100% a cég által előállított kivonat) és 37 °C-on inkubáltam 24 órát (6. ábra). Az idő letelte után digitális tolmércével lemértem a lyuk körül annak a zónának az átmérőjét, ahol nem fejlődtek ki a mikroorganizmusok (gátlási zóna, tartalmazza a lyuk átmérőjét is). Minél nagyobb volt a kör átmérője, annál nagyobb antimikrobiális hatással rendelkezett a vizsgált kivonat [19].

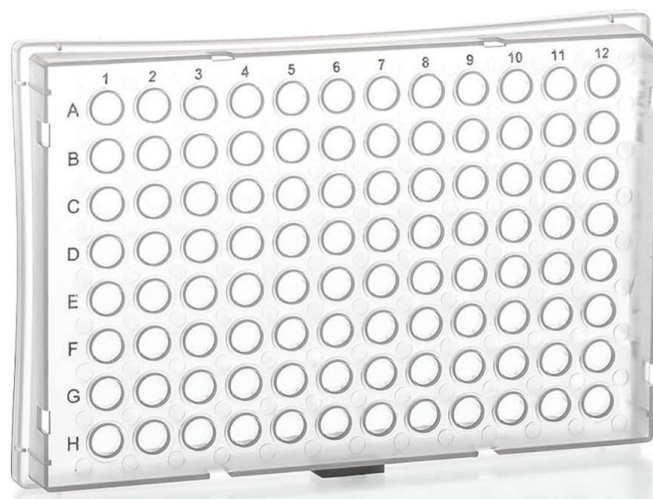


6. ábra: Az agar diffúziós módszer vázlata (forrás: 51)

4.2.3 Táplevesben történő tenyésztési eljárás

A táplevesben történő tenyésztési módszer egy egyszerű vizsgálat az antimikrobiális hatás kimutatásához. Lényege, hogy az elkészített tápleveshez adagoljuk az adott mikroorganizmust, illetve az antimikrobiális hatású anyagot [20].

Ahhoz, hogy egyszerre több koncentrációban vizsgálhassuk az antimikrobiális anyag hatását mikrotitráló lemezben (7. ábra) végeztem a kutatást, így egyszerre több ismételtsben és több koncentrációban vittem véghez ugyanazt a kísérletet.

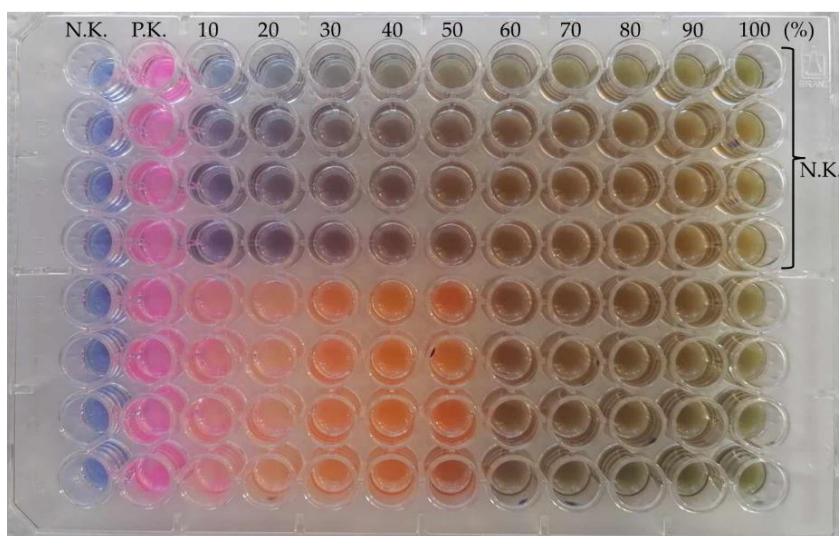


7. ábra: Mikrotitráló lemez

Ezen módszer esetében kétféle vizsgálatról lehet beszélni a MIC (minimális gátló koncentráció) és az MBC (minimális baktericid koncentráció) meghatározásáról.

A minimális gátló koncentráció meghatározásához Agbeby és mtsai. (2022) illetve El. Baabouaa és mtsai. (2022) módszerét vettem alapul [47], [48]. A mikrotitráló lemezbe különböző koncentrációjú kivonatokat pipettáztam (10-100%, ahol a 100% a cég által

elkészített kivonat). A hígítás táplevessel történt és a kivonat+tápleves mennyisége minden esetben 100 μL volt. 24 órás mikrobatenyészetből 1-es optikai denzitású szuszpenziót készítettem és ebből adagoltam 20 μL -t a különböző koncentrációjú kivonatokhoz, majd 37 °C-on 24 órát inkubáltam. Inkubálás után 10 μL 0,01 mg/mL-es rezazurin oldatot adagoltam és további 2 órát inkubáltam 37 °C-on. A mikrobiális növekedés követhető volt a rezazurin színváltozásából, ugyanis kék szín esetén nem volt növekedés, míg a rózsaszín esetében a mikrobák növekedtek. A minimális gátló koncentráció az a legkisebb kivonat koncentráció, ahol már nem volt növekedés, vagyis nem lett rózsaszín a keverék. (8. ábra)



8. ábra: A rezazurin színváltozása (N.K. – negatív kontroll, P.K. – pozitív kontroll)

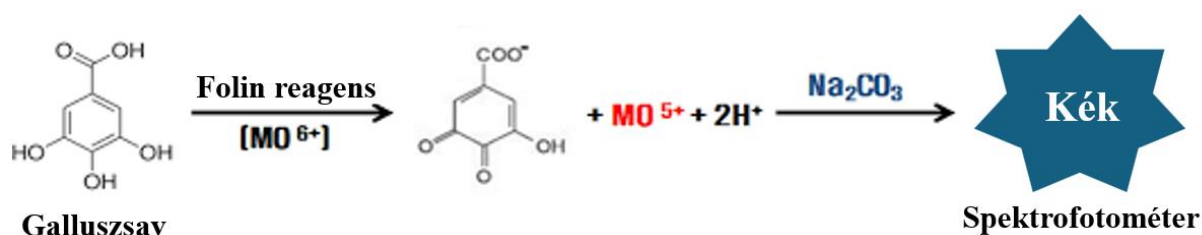
Annak érdekében, hogy pontosabb eredményeket kapjak az inkubálás után hígítási sort készítettem a különböző koncentrációjú keverékekből és kiszélesztettem Nutrient agarra, majd 24 óra inkubálás után leszámoltam a telepeket (9. ábra). Meghatároztam a kezdeti baktériumszuszpenzió sejtszámát (TKE/mL) is, így egy pontosabb képet kaptam, hogy milyen ütemben növekedtek, illetve pusztultak el a baktériumok és ez által a minimális baktericid koncentrációt (MBC) is meg tudtam határozni, amely lényegében az a legkisebb koncentráció, ahonnan kiszélesztve nem jelennek meg baktériumtelepek, vagyis a kivonat teljesen megöli a mikrobákat.



9. ábra: *Staphylococcus aureus* telepek

4.2.4 TPC módszer Folin Ciocâlteu reagenssel

A TPC (Total Polyphenolic Content-Összes polifenol tartalom) módszer lényege, hogy a Folin Ciocâlteu reagens tartalmaz sárga Mo (VI) ionokat, melyek az antioxidánsok hatására Mo (V) ionokká redukálódnak, amely egy kék színű vegyület (10. ábra). Ez a kék színű oldat spektrofotométer (4. ábra) segítségével 760 nm-en mérhető [21].



10. ábra: A színekialakulás folyamata [50]

A mérés elvégzéséhez szükségem volt Folin-Ciocâlteu reagensre, metanolra, nátrium-karbonátra, galluszsavra, a kivonatokra és desztillált vízre.

Kezdetben elkészítettem a 0,7 M-os Na-karbonát oldatot, amely során 7,42 g Na-karbonáthoz 100 ml desztillált vizet adagoltam, majd a metanolos oldatot készítettem el, amely során 16 ml metanolhoz 4 ml desztillált vizet adtam. A mintaelegyek esetében 250 μl Folin-Ciocâlteu reagenshez 20 μl kivonatot, 200 μl metanol oldatot, 1 ml Na-karbonát oldatot és 5 ml desztillált vizet adagoltam [49].

A kalibrációs egyeneshez galluszsavból készített standardokat hoztam létre 5, 10, 15, 20 mg/ml koncentrációban, majd a standardokat és a mintákat $\lambda=760$ nm hullámhosszon lemértem.

Az eredményeket mg galluszsav/100 g szárazanyagban adtam meg.

4.2.5. Statisztikai vizsgálatok

Minden mérést háromszor végeztem el, az eredmények átlag±szórás formájában vannak kifejezve. Az agar diffúziós módszer esetében a különböző gátlási zónák közti összefüggéseket IBM SPSS Statistics 26 programban tártam fel alkalmazva a varianciaanalízis módszerét és a Tukey HSD tesztet. A különböző koncentrációk által létrehozott gátlási zónákat akkor tekintettem szignifikánsan eltérőnek, amikor $p < 0,05$.

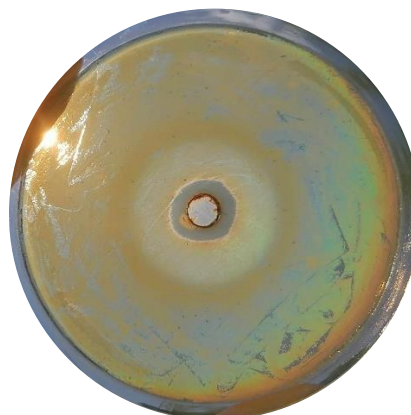
5. Eredmények és kiértékelésük

5.1. Az agar diffúziós módszer eredményei

Az agar diffúziós módszer alapján a *Salmonella enterica* és az *Escherichia coli* baktériumokat egyik kivonat sem gátolta, viszont a *Bacillus cereus* és a *Staphylococcus aureus* baktériumokat mindkét extraktum gátolta (11. ábra), illetve a *Listeria monocytogenes*-el szemben a homoktövis kivonat mutatott mikrobagátló hatást, a kökény nem (5. táblázat).



Bacillus cereus - homoktövis 100%



Staphylococcus aureus – homoktövis 100%

11. ábra: A kivonatok által létrehozott gátlási zónák

A 11. ábrán megfigyelhetők középen a gátlási zónák, látható, hogy a homoktövis a *Staphylococcus aureus* esetében hatékonyabb, vagyis a gátlási zóna nagyobb, mint a *Bacillus cereus* esetében.

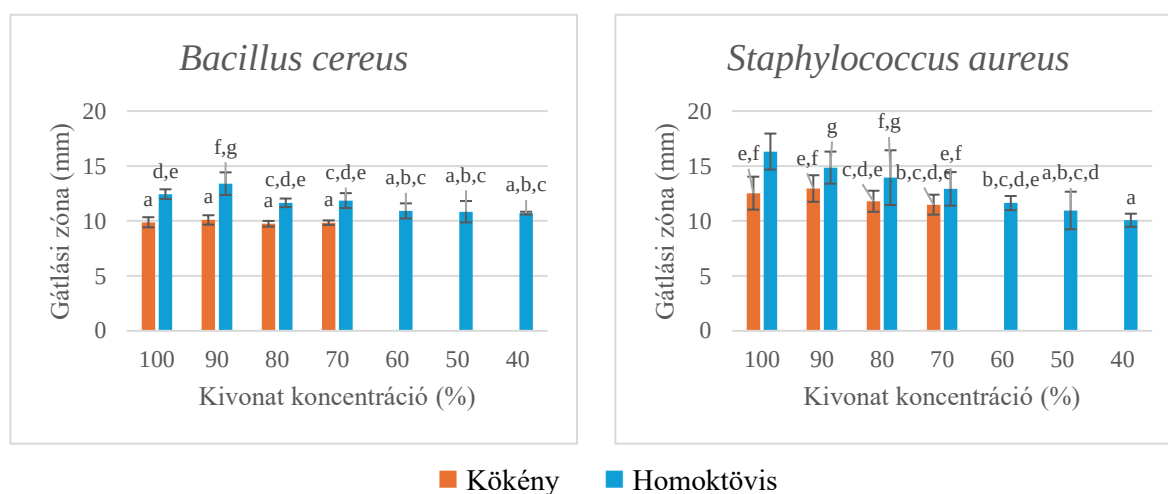
5. táblázat: Az agar diffúziós módszer eredményei

Baktérium	Kivonat	Kivonat koncentrációja (%)	Gátlási zóna (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	Kökény	100	9,88±0,46 ^a
		90	10,09±0,43 ^a
		80	9,74±0,26 ^a
		70	9,84±0,21 ^a
		60	0±0
	Homoktövis	100	12,44±0,44 ^{d,e}
		90	13,39±1,03 ^{f,g}
		80	11,65±0,39 ^{c,d,e}
		70	11,85±0,68 ^{c,d,e}
		60	10,91±0,69 ^{a,b,c}
		50	10,84±0,97 ^{a,b,c}
		40	10,71±0,13 ^{a,b,c}
		30	0±0
<i>Escherichia coli</i>	Kökény	100	0±0
	Homoktövis	100	0±0
<i>Listeria monocytogenes</i>	Kökény	100	0±0
	Homoktövis	100	10,34±0,38 ^{a,b}
		90	0±0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kökény	100	12,53±1,5 ^{e,f}
		90	12,95±1,21 ^{e,f}
		80	11,79±0,96 ^{c,d,e}
		70	11,48±0,91 ^{b,c,d,e}
		60	0±0
	Homoktövis	100	16,31±1,64
		90	14,85±1,46 ^g
		80	13,94±2,49 ^{f,g}
		70	12,92±1,53 ^{e,f}
		60	11,63±0,64 ^{b,c,d,e}
		50	10,95±1,71 ^{a,b,c,d}
		40	10,06±0,6 ^a
		30	0±0
<i>Salmonella enterica</i>	Kökény	100	0±0
	Homoktövis	100	0±0

Az eredmények átlag±szórásban vannak kifejezve, a gátlási zónák tartalmazzák a lyuk átmérőjét is (8 mm). A különböző számmal illetett értékek (^{a-g}) statisztikailag különböznek egymástól (p < 0,05) a Tukey HSD tesztnek megfelelően.

Az 5. táblázat és 12. ábra alapján a homoktövis rügykivonat hatásosabbnak bizonyult, vagyis nagyobb antimikrobiális hatást mutatott a kökény kivonatnál, továbbá megfigyelhető, hogy a koncentráció csökkenésével átlagosan csökken a gátlási zóna nagysága is, amely a

csökkenő bioaktív komponens koncentrációval hozható összefüggésbe. Statisztikai vizsgálatok alapján számos esetben nincs szignifikáns eltérés a különböző kivonat koncentrációk által létrehozott gátlási zónák nagyságában, ez azt jelenti, hogy például a *Bacillus cereus* esetében a kökény rügykivonat koncentrációtól függetlenül azonos gátlási zónát hozott létre. A Tukey HSD teszt alapján számos esetben megfigyelhető hasonló jelenség, amely lényegében azt jelenti, hogy a különböző kivonatok és kivonat koncentrációk kölcsönösen felcserélhetők, hiszen hatásuk egyforma.



12. ábra: Az agar diffúziós vizsgálat eredményei

5.2. A tápvelesben történő tenyésztéses módszer eredményei

A tápvelesben történő tenyésztéses eljárás során vizsgáltam a minimális gátló- és minimális baktericid koncentrációkat (MIC és MBC). A minimális gátló koncentráció eredményeinél a kioltásos- és a rezazurinos módszer eredményei nem minden esetben egyeztek meg, bizonyos esetekben a rezazurinos MIC érték nagyobb volt, mint a kioltásos MIC érték, amely azzal magyarázható, hogy az inkubálás alatt a mikrobák végeztek anyagcserefolyamatokat, szaporodtak, viszont a kivonat hatására el is pusztultak, így inkább a kioltásos módszert vettem figyelembe az eredmények összesítésénél. Összességében a homoktövis rügykivonat teljesített jobban, ugyanis esetében már az alacsonyabb kivonat koncentrációk is gátolták a baktériumok szaporodását, például a *Staphylococcus aureus* esetében már 20%-os kivonat sem engedte növekedni a mikrobákat. A kökény rügykivonat esetében csak 30% fölötti koncentrációk váltották ki a gátló hatást (6. táblázat és 7. táblázat).

A kioltásos módszer esetében a sejtszámok logaritmált értékeit a 6. táblázat tartalmazza. A táblázatban kiemelten láthatóak azok az értékek, ahol a végső sejtszám kisebb,

mint a kezdeti, vagyis a mikrobák már nem szaporodtak. A táblázatban továbbá megtalálhatók a MBC értékek is, amelyek azok a koncentrációk, ahol a végső sejtszám 0. A baktericid hatást a kökény rügykivonat két mikroorganizmus (*Listeria monocytogenes* és *Salmonella enterica*) esetében is elérte, míg a homoktövis csak a *Salmonella enterica* esetében.

6. táblázat: A táplevesben történő tenyésztési eljárás eredményei

	Koncentráció (%)	Kökény		Homoktövis	
		Kezdeti	Végső	Kezdeti	Végső
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	8,07	8,32	8,07	8,52
	10	8,07	8,47	8,07	8,30
	20	8,07	7,91	8,07	7,50
	30	8,07	7,55	8,07	4,65
	40	8,07	6,57	8,07	4,49
	50	8,07	4,51	8,07	4,34
	70	8,07	2,23	nt	nt
	100	8,07	1,54	8,07	6,47
<i>Bacillus cereus</i>	0	6,87	7,73	6,89	7,81
	10	6,87	7,25	6,89	7,04
	20	6,87	6,93	nt	nt
	30	6,87	6,44	6,89	6,64
	40	6,87	6,38	6,89	6,70
	90	6,87	6,40	nt	nt
	100	6,87	6,37	6,89	6,62
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	7,84	9,00	8,01	8,25
	10	7,84	7,62	8,01	8,11
	20	7,84	7,81	8,01	8,06
	30	7,84	7,21	8,01	7,87
	40	7,84	6,66	8,01	7,78
	50	7,84	0,00	8,01	7,91
	60	7,84	0,00	8,01	7,96
	70	7,84	0,00	8,01	5
	80	7,84	0,00	nt	nt
	90	7,84	0,00	nt	nt
	100	7,84	0,00	8,01	2
<i>Salmonella enterica</i>	0	7,58	9,73	7,26	9,23
	10	7,58	8,42	7,26	8,17
	20	nt	nt	7,26	8,26
	30	7,58	8,12	7,26	8,28
	40	7,58	7,92	7,26	7,83
	50	7,58	7,90	7,26	5,08
	60	7,58	2,69	7,26	2,31
	70	7,58	0,00	7,26	0,00
	80	7,58	0,00	7,26	0,00

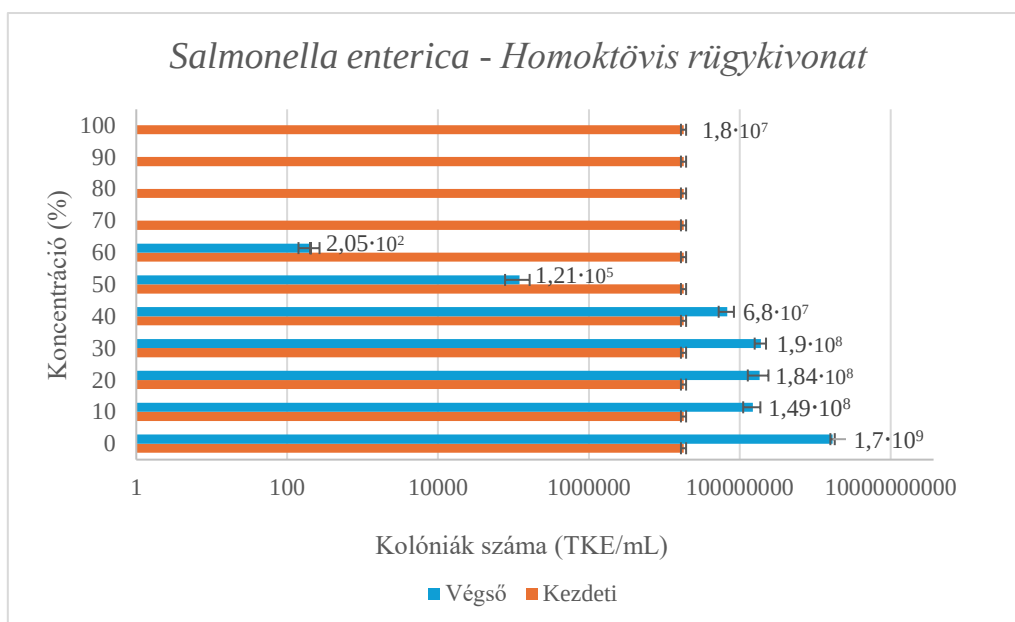
<i>Escherichia coli</i>	90	7,58	0,00	7,26	0,00
	100	7,58	0,00	7,26	0,00
	0	7,81	10,60	7,59	9,01
	10	7,81	10,54	7,59	8,99
	20	nt	nt	7,59	8,72
	30	nt	nt	7,59	7,73
	40	nt	nt	7,59	7,23
	50	7,81	7,85	7,59	6,46
	60	7,81	7,61	7,59	6,09
	70	7,81	7,07	7,59	6,15
	100	7,81	5,54	7,59	5,04

nt- nem tesztelt. A kezdeti és a végső sejtszámok tízes alapú logaritmusban vannak megadva.

A MIC és az MBC értékek a 7. táblázatban vannak összesítve, továbbá a 13. ábra grafikusán ábrázolja a *Salmonella enterica* baktériumra a homoktövis rügykivonat hatását.

7. táblázat: A minimális gátló- és minimális baktericid koncentrációk

Vizsgált mikroorganizmusok	Kökény rügykivonat		Homoktövis rügykivonat	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Bacillus cereus</i>	30	-	30	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	30	70	70	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	-	20	-
<i>Escherichia coli</i>	70	-	40	-
<i>Salmonella enterica</i>	60	100	50	70



13. ábra: A minimális gátló koncentráció és a minimális baktericid koncentráció a homoktövis rügykivonat esetében a *Salmonella enterica* baktériumra nézve

5.3. A TPC módszer eredményei

A TPC módszer alapján a homoktövis rügy kivonatában $342,99 \pm 8,06$ mg galluszsav/100 mL található, míg a kökényében $137,92 \pm 15,34$ (8. táblázat). A szakirodalomban nagyon kevés adat található a rügykivonatok polifenol tartalmáról, egyelőre még a gyümölcsök és a levelek vannak a vizsgálatok középpontjában, így az eredményeim összehasonlítása más kutatásokkal nehézkes. Dedić és mtsai. (2021) kutatásában a száraz kökény levél polifenol tartalma $8,31 \pm 0,03 - 27,45 \pm 0,12$ mg galluszsav/g száraz level között változott, míg Korekar és mtsai. (2011) esetében a homoktövis polifenol tartalma $32,49 \pm 1,19 - 83,07 \pm 3,66$ közötti értékeket mutatott. Ha összehasonlítjuk az én értékeimmel akkor megfigyelhető, hogy közeliek az értékek, ami nem annyira meglepő, hiszen a levelek a rügyekből alakulnak ki. Ezzel ellentétben a gyümölcsök esetében jóval alacsonyabb értékeket mértek, pl. Marčetić és mtsai. (2022) friss kökény gyümölcsök esetében $34,24 \pm 1,39 - 321,36 \pm 9,13$ közötti értékeket mértek 100 g gyümölcsre vonatkoztatva, továbbá Korekar és mtsai. (2011) esetében a száraz homoktövis gyümölcs polifenol tartalma $1666 \pm 61,40 - 4578 \pm 343,68$ között változott 100 g gyümölcsre viszonyítva, amelyet ha összehasonlítunk az általam mért értékekkel megfigyelhető, hogy jóval alacsonyabbak az értékek a gyümölcsök esetében. Ez valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a gyümölcsökben az érés során bizonyos polifenolok lebomlanak, átalakulnak, így csökken a koncentrációjuk.

8. táblázat: Az általam mért polifenol koncentrációk és a szakirodalomban fellelhető értékek [44],[45],[46]

Minta neve	Koncentráció (mg galluszsav/ 100 ml kivonat)	Koncentráció (mg galluszsav/ g száraz rügy)	Koncentráció (mg galluszsav/ g friss rügy)	Koncentráció (mg galluszsav/ 100 g gyümölcs)	Koncentráció (mg galluszsav/ g száraz levél)
Kökény	137,92±15,34	26,39±2,93	23,75±2,64	34,24±1,39 – 321,36±9,13 (Marčetić és mtsai., 2022) friss	8,31±0,03 – 27,45±0,12 (Dedić és mtsai., 2021)
Homoktövis	342,99±8,06	65,64±1,54	59,08±1,38	1666±61,40 – 4578±343,68 (Korekar és mtsai., 2011) száraz	32,49±1,19 – 83,07±3,66 (Korekar és mtsai., 2011)

6. Következtetések

A kutatás során számos érdekes eredményre figyeltünk fel.

A homoktövis kivonatban több polifenol volt mérhető és ezzel párhuzamosan erősebb antimikrobiális hatással rendelkezett, mint a kökény rügykivonat, ezáltal elmondható, hogy a polifenolok hozzájárulnak az antimikrobiális hatás kialakulásához.

A táplevesben történő tenyésztési eljárás esetében egyértelműen erősebb hatás volt megfigyelhető, mint az agardiffúziós módszer esetében. Ez azzal magyarázható, hogy az agardiffúziós módszernél nem érintkeznek a mikroorganizmusok közvetlenül a kivonatokkal, míg a tápleves esetében direkt érintkezés van, így a kivonatokban található antimikrobiális anyagok (fenolsavak, flavonoidok stb.) jobban ki tudják fejteni a hatásukat.

Statisztikai vizsgálatok alapján egyes kivonat koncentrációk azonos gátló hatást képesek elérni különböző baktériumok esetében, így akár kölcsönösen fel is cserélhetők.

Baktericid hatás csak kevés esetben volt megfigyelhető a táplevesben történő tenyésztés során, ezáltal megállapítható, hogy a kivonatoknak inkább bakteriosztatikus hatásuk van. Ennek előnyeit egy antibiotikum kezelés során is ki lehet használni, ugyanis, ha a kivonat nem engedi szaporodni a káros mikrobákat akkor a szükséges antibiotikumok könnyebben és rövidebb idő alatt lesznek képesek elpusztítani őket.

7. Összefoglalás

Röviden összefoglalva kutatásom során sikerült igazolnom a kökény és a homoktövis rügykivonatok antimikrobiális hatását egyes patogén mikroorganizmusokkal szemben. Ez új eredménynek számít, hiszen a rügykivonatok vizsgálata még nem elterjedt, nagyon kevés szakirodalmi cikk található a témában. A kutatás jelentőségét tovább növeli, hogy napjainkban az antibiotikum rezisztencia egy nagyon elterjedt és rengeteg problémát okozó jelenség, így minden olyan vizsgálat, amely arra irányul, hogy új antimikrobiális szereket kutasson teljes mértékben időszerű és előremutató. A rügykivonatok további előnye, mint antimikrobiális szerek, hogy nem alakulhat ki rájuk antibiotikum rezisztencia, hiszen rengeteg összetevő található bennük.

A kutatás során továbbá igazolódott, hogy mindkét extraktum magas polifenol tartalommal rendelkezik, amely révén rengeteg pozitív hatást képesek kifejteni az emberi szervezetre.

A kutatás további célkitűzése, ezen rügykivonatok tejsavbaktériumokra gyakorolt hatásának vizsgálata és ez alapján funkcionális élelmiszerek fejlesztése.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom vezető tanáromnak Dr. György Éva egyetemi professzornak és Héjja Melinda PhD hallgatónak a kutatásban nyújtott önzetlen segítségükért és támogatásukért. Ezen felül hálás vagyok a PlantExtrakt cégnek és különösen dr. Oláh Neli-Kingának, hogy biztosította a kivonatokat és végül, de nem utolsó sorban dr. Máthé Endre tanár úrnak, a Debreceni Egyetem Táplálkozástudományi Intézet vezetőjének, a téma ajánlásáért. Ezen kutatás nélkülük nem jöhetett volna létre. Köszönöm!

9. Irodalomjegyzék

- [1] Grahame W. Gould. 1996. *Industry Perspectives on the Use of Natural Antimicrobials and Inhibitors for Food Applications*. *Journal of Food Protection*, Supplement, 82-86.
- [2] Board. R. G. 1995. Natural antimicrobials from animals, ch. 3. In G.W. Gould (ed.), *New Methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- [3] Wilkins, K. M., and R. G. Board. 1989. Natural antimicrobial systems, ch 11. In G. W. Gould (ed.), *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Elsevier Applied Science, London.
- [4] Al-Zoreky, N., J. W. Ayres, and W. E. Sandine. 1991. *Antimicrobial action of Microgard against food spoilage and pathogenic microorganisms*. *J. Dairy Sci.* 748-763.
- [5] Tana Hintz, Karl K. Matthews, and Rong Di. 2015. *The Use Of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation*. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/246264/> (megnyitva: 2024.04.11.).
- [6] Larry R. Beuchat. 1996. *Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce*. *Journal of Food Protection*. 204-216.
- [7] <https://www.reactgroup.org/news-and-views/news-and-opinions/year-2022/7-7-million-people-die-from-bacterial-infections-every-year/#:~:text=7.7%20million%20deaths%20around%20the%20world%20were%20found%20linked%20to,leading%20cause%20of%20death%20globally.&text=There%20are%20large%20differences%20in,of%20bacterial%20pathogens%20across%20regions.> (megnyitva: 2024.04.11.) .
- [8] http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj_ (megnyitva: 2024.04.12.).
- [9] R. Gupta, S. Patel, M. Singh. 2012. *Natural vs. Synthetic Antimicrobial Agents: A Comparative Analysis*. 30-34.

- [10] Mariana Ferdes. 2018. *Antimicrobial Compounds from plants. Fighting Antimicrobial Resistance*. 271-273.
- [11] Mukhrizah Othman, Hwei San Loh, Christophe Wiart, Teng Jin Khoo, Kuan Hon Lim, Kang Nee Ting. 2011. *Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. Journal of Microbiological Methods*. 161-166.
- [12] <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Prunus+spinosa> (megnyitva: 2024.04.12.)
- [13] I. Popescu, G. Caudullo. 2016. *Prunus spinosa in Europe: distribution, habitat, usage and threats*.
- [14] Y.Erturk, S. Ercisli, M. Tosun. 2009. *Physico-chemical characteristics of wild plum fruits (Prunus spinosa L.)*.
- [15] <https://pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Hippophae+rhamnoides> (megnyitva: 2024. 04. 12.).
- [16] Geetha Suryakumar, Asheesh Gupta. 2011. *Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). Journal of Ethnopharmacology*. Volum 138. 268-278.
- [17] Tina Lougas. 2006. *Study on Physico-Chemical Properties and some Bioactive Compounds os Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides L.)*. 10-12.
- [18] <https://www.biotrend.com/en/buy/cat-nutrient-agar-non-selective-solid-5493.html> (megnyitva: 2024. 04. 12.).
- [19] Boyan Bonev, James Hooper, Judicael Parisot. 2008. *Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method*.
- [20] Tóth Erika, Borsodi Andrea, Makk Judit, Romsics Csaba, Felföldi Tamás, Jáger Katalin, Vajna Balázs, Ács Éva, Palatinszky Márton, Márialigeti Károly. 2018. *Klasszikus és Molekuláris Mikrobiológiai Laboratóriumi Gyakorlatok*. 77-100.

[21] Papp Nóra. 2014. *Csonthéjas gyümölcsök antioxidáns kapacitásának és a meggy polifenol-mintázatának vizsgálata*. 32-33.

[22] Michael P. Doyle, Robert L. Buchanan. 2012. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 491-502.

[23] Mitchell L. Gray, Arden H. Killinger. 1996. *Listeria monocytogenes and Listeric infections*. 309-311.

[24] Timothy J. Foster. 2002. *Molecular Medical Microbiology*. 839-888.

[25] Arun K. Bhunia. 2018. *Salmonella enterica*. *Foodborne Microbial Pathogens*. 271-287.

[26] Int. J. Environ. Res. Public Health. 2013. 6235-6254
<https://doi.org/10.3390/ijerph10126235> (megnyitva: 2024. 04. 12.).

[27] G. C. Schito. 2006. *The importance of the development of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 3-8.

[28] Bwalya Lungu, Corliss A. O`Bryan, Arunachalam Muthaiyan, Sara R. Milillo, Michael G. Johnson, Philip G. Crandall, Steven C. Ricke. 2011. *Listeria monocytogenes: Antibiotic Resistance in Food Production*. *Foodborne Pathogens and Disease*.

[29] K. Bernhard, H. Schrempf, W. Goebel. 1977. *Bacteriocin and Antibiotic Resistance Plasmids in Bacillus cereus and Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 897-902.

[30] Shu-Kee Eng, Priya Pusparajah, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Hooi-Leng Ser, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee. 2015. *Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance*. *Frontiers in Life Science*. 284-291.

[31] Johann D. D. Pitout. 2012. *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: a combination of virulence with antibiotic resistance*. *Frontiers in Microbiology*.

- [32] Luisa Pozzo, Rossella Russo, Stefania Frassinetti, Francesco Vizzarri, Július Árvay, Andrea Vornoli, Donato Casamassima, Marisa Palazzo, Clara Maria Della Croce Vincenzo Longo. 2020. *Wild Italian Prunus spinosa L. Fruit Exerts In Vitro Antimicrobial Activity and Protects Against In Vitro and In Vivo Oxidative Stress*.
- [33] P. S. Negi, A. S. Chauhan, G. A. Sadia, Y. S. Ramteke. 2005. *Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed extracts. Food Chemistry*. 119-124.
- [34] Simona Nitu. 2015. *The effectiveness of gemmotherapy in current medical practice. Arad Medical Journal*. 72-74.
- [35] Aiping Liu, Qingqing Wan, Jianlong Li, Qin Li, Kaidi Hu, Xiaolin Ao, Shujuan Chen, Li He, Xinjie Hu, Bin Hu, Yong Yang, Likou Zou, Shuliang Liu. 2023. *Rose bud extract as a natural antimicrobial agent against Staphylococcus aureus: Mechanisms and application in maintaining pork safety*.
- [36] Xiaoqin He, Yong Tian, Lin Lei, Qi Zhi, Jichun Zhao, Jin Ming. 2020. *Protective effects of Coreopsis tinctoria buds extract against cognitive impairment and brain aging induced by D-galactose*.
- [37] Zuzana Kovalikova, Jan Lnenicka, Rudolf Andrys. 2021. *The Influence of Locality on Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Bud Extracts*. <https://doi.org/10.3390/foods10071608>.
- [38] Mirjana Marcetic, Steven Samardzik, Tijana Ilic, Dragana, Bozik, Bojana Vidovic. 2022. *Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Enzymatic, Antimicrobial and Prebiotic Properties of Prunus Spinosa L. Fruits*.
- [39] Oana-Raluca Negrean, Anca Corina Farcas, Oana Lelia Pop, Sonia Ancuta Soacaci. 2023. *Blackthorn-A Valuable Source of Phenolic Antioxidants with Potential Health Benefits*.

- [40] Oana Negrean, Anca Farcas, Sonia Socaci, Calina Ciont, Madalina Medeleanu, Elemer Simon, Oana Pop. 2023. *Extraction and Characterization of Bioactive Compounds from Prunus Spinosa L. Fruits with Potential in the Development of Edible Films.*
- [41] Barka A. Khan, Naveed Akhtar, Tariq Mahmood. 2010. *A Comprehensive Review of a Magic Plant, Hippophae rhamnoides.*
- [42] Thomas S. c. Li, Thomas H. J. Beveridge. 2003. *Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides): Production and Utilization.* 101-109.
- [43] Peter Capek, Zuzana Kostalova. 2022. *Isolation, chemical characterization and antioxidant activity of Prunus spinosa L. fruit phenolic polysaccharide-proteins.*
- [44] Korekar G., Stobdan T., Singh H., Chaurasia OP., Singh S.B. (2011). Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Various Solvent Extracts from Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Fruit Pulp, Seeds, Leaves and Stem Bark. *Acta Alimentaria.* 40 (4). 44-458., doi: 10.1556/AAlim.40.2011.4.4.
- [45] Marčetić M, Samardžić S, Ilić T, Božić DD, Vidović B. (2022). Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Enzymatic, Antimicrobial and Prebiotic Properties of *Prunus spinosa* L. Fruits. *Foods.* 11 (20). doi: 10.3390/foods11203289.
- [46] Dedić A, Džudžević-Čančar H., Alispahić A., Tahirović I., Muratović E. (2021). *In-Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activity of Aerial Parts of *Prunus Spinosa* L. Growing Wild in Bosnia and Herzegovina. *IJPSR.* 12 (7). 3643-3653.
- [47] Agbebi, E.A.; Alabi, O.S.; Nkrumah, A.O.; Ogbole, O.O. Evaluation of the Antibacterial and Antifungal Potentials of Peptide- Rich Extracts from Selected Nigerian Plants. *Eur. J. Integr. Med.* 2022, 54, 102163. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2022.102163>.
- [48] El Baaboua, A.; El Maadoudi, M.; Bouyahya, A.; Belmehdi, O.; Kounnoun, A.; Cheyadmi, S.; Ouzakar, S.; Senhaji, N.S.; Abrini, J. Evaluation of the Combined Effect of Antibiotics and Essential Oils against *Campylobacter* Multidrug Resistant Strains and Their

Biofilm Formation. *S. Afr. J. Bot.* 2022, 150, 451–465.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.08.027>.

[49] Balogh E.: Antioxidáns kapacitás meghatározása és ennek kialakításában szerepet játszó vegyületek vizsgálata bogyós gyümölcsök esetében, PhD értekezés, Corvinus Egyetem, Budapest, 2010.

[50] Hu, S., Kim, J.A., Moon, M.H., Lee, S.H., Yoon, H.S., Hong, J.H.: Standardization for analysis method of total polyphenol in complex of Picao Preto, *Journal of Food Hygiene and Safety*, 33 (1), 2018, 44-49, doi: 10.13103/JFHS.2018.33.1.44.

[51] <https://www.biologydiscussion.com/medical-microbiology/top-4-tests-for-antimicrobial-drug-susceptibility/55863>, (megnyitva: 2024.01.15.)