

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA 2024
SAPIENTIA EMTE - MAROSVÁSÁRHELYI KAR

**Természetes eredetű anyagok hatásának vizsgálata élelmiszeripari
jelentőségű mikroorganizmusokra**

Hallgató: Madarász Emil – fenntartható biotechnológiák mesteri szak, II. év.

Témavezető: *dr. György Éva* professzor - Élelmiszertudományi Tanszék

Marosvásárhely
2024. április 26.

Tartalom

1. Bevezetés	5
1.1. Természetes antimikrobiális anyagok	5
1.1.1. Növényi eredetű antimikrobiális anyagok. Az illóolajok	5
1.2. Növényi eredetű anyagok hatása a baktériumokra és gyakorlati alkalmazásuk	12
1.3. Antibiotikum rezisztencia	14
1.4. Élelmiszeripari szempontból jelentős patogén baktériumok.....	14
1.4.1. <i>Escherichia coli</i>	14
1.4.2. <i>Bacillus cereus</i>	15
1.4.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	15
1.4.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.4.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.4.6. <i>Salmonella</i> spp.	16
1.5. Mikroszkopikus gombák	16
2. Anyag és módszertan.....	18
2.1. A kakukkfű illóolaj, kapor illóolaj és a timol antimikrobiális hatásának vizsgálata.....	18
2.2. A vizsgált baktériumok antibiotikum rezisztenciájának a meghatározása.....	18
2.3. Az illóolajok hatása és az antibiotikum rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata.....	19
3. Eredmények értékelése	20
3.1. Kakukkfű és kapor illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálati eredményei.	20
3.2. A timol antibakteriális hatásának vizsgálati eredményei.....	23
3.3. A vizsgált baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának vizsgálati eredményei	25
3.4. Kakukkfű illóolaj és kapor illóolajat tartalmazó táptalajon, valamint timol tartalmú táptalajon tenyésztett baktériumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálati eredményei	26

4.	Következtetések.....	30
5.	Összefoglaló	31
6.	Köszönetnyilvánítás.....	32
7.	Szakirodalmi jegyzék.....	33

Természetes eredetű anyagok hatásának vizsgálata élelmiszeripari jelentőségű mikroorganizmusokra

Madarász Emil¹

¹Sapientia EMTE, Csíkszeredai Kar, Fenntartható Biotechnológiák Mesteri Szak, 2. év
E-mail: madaraszemil@uni.sapientia.ro

Témavezetők:

dr. György Éva professzor¹

¹Sapientia EMTE, Csíkszeredai Kar, Élelmiszertudományi Tanszék
E-mail: gyorgyeva@uni.sapientia.ro

A természetes eredetű antimikrobiális hatású anyagok, különösen a növényi illóolajok és azok hatóanyagai egyre növekvő figyelmet kapnak a mikrobagátló és a tartósító tulajdonságaik miatt. Felhasználásuk lehetőséget teremthet az új fogyasztói igények kielégítésére az egészségesebb élelmiszerek iránt. A kakukkfű nem csupán egy népszerű fűszernövény, hanem az illóolajának összetételében található timol révén jelentős antimikrobiális tulajdonsággal rendelkezik.

Kutatásunk célja a kapor (*Anethum graveolens* L.) illóolaj, a kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) illóolaj és a fő hatóanyagának a timolnak az antimikrobiális hatásának meghatározása agardiffúziós módszerrel élelmiszeripari szempontból jelentős mikroorganizmusok esetében: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negatív), *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (Gram-pozitív) és mikroszkopikus gombák. A kiválasztott baktériumok antibiotikum rezisztenciáját is vizsgáltuk nyolc antibiotikumra. A kakukkfű illóolaj 0,5%-os koncentrációban gátolta a baktériumok növekedését, míg hatóanyaga, a timol, 1%-os koncentrációban is jelentős gátlást mutatott. A kapor illóolaj esetében gyengébb antimikrobiális hatás volt kimutatható, viszont miután egyes antibiotikum-rezisztens baktériumokat kakukkfű és kapor illóolaj stresszhatásnak tettünk ki az antibiotikumokkal szembeni érzékenységük jelentősen megnőtt. A kapott eredmények alapján a vizsgált növényi illóolajok felhasználhatók lehetnek az antibiotikum rezisztens baktériumokkal szembeni küzdelemben.

1. Bevezetés

A közelmúltban számos hagyományos élelmiszer-tartósítási technológiát alkalmaztak az élelmiszerromlást okozó mikroorganizmusok elleni küzdelemben, azonban észrevették, hogy a szintetikus tartósítószeresek, mint például a nitrit, nitrát, benzoát, propionát, szorbát, és szulfit számos egészségügyi problémát vetettek fel a fogyasztók körében. Ezek az adalékanyagok hosszú távú használata májkárosodást, asztmát, allergiás reakciókat, sőt rákos megbetegedést is okozhat. Ezért a fogyasztók egyre tudatosabbak a szintetikus alapú antimikrobiális anyagokkal kapcsolatban és ezek az aggodalmak egyre inkább a természetes antimikrobiális szerek használatát növelik (Saeed és mtsai., 2019).

Számos természetes eredetű antibakteriális anyag található meg a természetben, amelyeket az élelmiszeriparban is hatékonyan lehet alkalmazni a mikroorganizmusok elleni küzdelemben. A növényi illóolajok (kapor, kakukkfű, oregánó), az állati eredetű enzimek (lizozim, laktoferrin), a mikrobiális bakteriocinek (nizin, natamicin), a szerves savak (szorbinsav, propionsav, citromsav) és a természetes polimerek (kitozán) mind ígéretes alternatívát nyújtanak a mesterséges tartósítószeresekkel szemben. Ezen anyagok nem csupán hatékonyabban pusztítják el a káros mikroorganizmusokat, de a fogyasztók számára is biztonságosabbak. A kutatások és fejlesztések ezen a területen egyre ígéretesebb eredményeket hoznak, hozzájárulva az élelmiszerbiztonság javításához.

A kutatás célkitűzése

- A kakukkfű és a kapor illóolajok, valamint a kakukkfű illóolaj hatóanyaga a timol antimikrobiális hatásának vizsgálata élelmiszeripari szempontból jelentős baktériumok és mikroszkopikus gombák esetében.
- A minimális gátló koncentráció meghatározása az antimikrobiális hatás hatékonyságának az értékelése céljából.
- A vizsgált baktériumok antibiotikum rezisztenciájának meghatározása.
- Az illóolajok hatása és az antibiotikum rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata.

1.1. Természetes antimikrobiális anyagok

1.1.1. Növényi eredetű antimikrobiális anyagok. Az illóolajok

Az illóolajok színtelen, aromás folyadékok, a természetben előforduló illékony szerves vegyületek, amelyek a növényi részekben, így a magokban, virágokban, héjban, szárban és

kéregben találhatóak (Bhavaniramya és mtsai., 2019). Az illóolajok másodlagos növényi anyagcseretermékek, amelyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a növények túlélési mechanizmusában, és ezen tulajdonságaiknak köszönhetően egyedülálló gyógyászati előnyökkel is rendelkeznek, mint például az antibakteriális és gombaölő hatás (Lin és mtsai., 2022).

A növényi illóolajok már a történelem kezdete óta kiemelt szerepet töltenek be az emberiség életében és nem csupán ízesítőanyagként, hanem gyógyászati és kozmetikai célokra is alkalmazzák őket. Az utóbbi évtizedekben egyre jobban felismerték az illóolajok antimikrobiális hatását és ma már számos területen alkalmazzák a mikroorganizmusok elleni küzdelemben, továbbá számos kereskedelmi termékben is megtalálhatóak, mint például mosószerekben, szappanokban, kozmetikumokban, gyógyszerekben, illatanyagokban, üdítőitalokban és gombaölő szerekben, valamint felhasználhatják még tartósításra szolgáló filmekben és ehető bevonatokban. Kimutatták, hogy az illóolajokat tartalmazó filmek és bevonatok nagyobb hatékonyságot mutattak a különféle élelmiszerekben a betakarítás után előtérbe kerülő gombák és az élelmiszerral terjedő baktériumok ellen, mint a tiszta filmek és bevonatok (Hou és mtsai., 2022).

A növényi illóolajok általában hatékonyabbak a Gram-pozitív baktériumokkal szemben, mint a Gram-negatívak ellen, azonban léteznek kivételek, mint például az oregánó, a szegfűszeg és a fahéj, amelyek mindkét baktériumcsoport ellen hatásosak. A növényekben, gyógynövényekben és fűszerekben található főbb antimikrobiális hatású illóolaj komponensek a fenolos vegyületek, terpének, alifás alkoholok, savak, valamint az aldehidek és ketonok (Kim & Fung, 2004).

1.1.1.1. Az illóolajok előállítása

Az illóolajok növényből való kinyerésére általában négyféle eljárást alkalmaznak: extrahálást, sajtolást, enfleurage eljárást és vízgőz desztillációt. Az *extrahálási* műveletet rendszerint melegen végzik, az oldószer forráspontjától függő hőmérsékleten. A használatos oldószerek: a petroléter, klórozott szénhidrogének, aceton, alkoholok. Az extrakció speciális módszere az úgynevezett szuperkritikus fluid extrakció, ahol szuperkritikus jelző az extrahálószer nyomás és hőmérséklet által definiált állapotát jelzi. Ebben az állapotban a nyomás és a hőmérséklet meghaladja az extrahálószerre jellemző kritikus értéket. Az extrahálószerként alkalmazott folyadék vagy gáz szuperkritikus állapotban van és nem tekinthető sem folyadéknak sem gáznak. A szuperkritikus fluidextrakcióhoz leggyakrabban használt gázok széndioxid, metán, etán, dinitrogén-oxid. Az *extrahálási* módszer

alkalmazásával a kevésbé poláris, illetve lipofil karakterű növényi szekunder anyagcsere termékek, mint az alkaloidok, laktonok, terpenoidok, szteroidok, speciális zsírsav gliceridek, zsírolékony vitaminok stb. kinyerésének új módja vált lehetővé.

A *sajtolási (préselés)* eljárást általában a citrusféléknél (narancs, citrom, mandarin) alkalmazzák, amelyeknek az illóolaja rendkívül érzékeny, már 100 °C körüli hőmérsékleten is károsodik, ezért vízgőz desztillációval nem nyerhető belőle jó minőségű olaj. Az illóolajat hideg úton, a termésfal sajtolásával vagy préselés után centrifugálással nyerik ki.

Az illóolajok kinyerésére használatos harmadik módszer az úgynevezett *Enfleurage (pomádés eljárás)* amelyet azoknál a növényeknél alkalmaznak, amelyekből más eljárással illóolajat nem állítanak elő, ilyen például a liliom. Az eljárás lényege, hogy az illóolajat tartalmazó növényi részt, rendszerint virágszirmot, egy-két milliméter vastag sertézsírréteggel takarják, majd a zsír által felvett illóolajat a zsírból alkohollal kivonják, illetve elválasztják.

A *desztilláció* pontosabban a vízgőz desztilláció vagy más néven hidrodesztilláció az illóolaj kinyerés leggyakrabban használatos módja (1.1.1. ábra). A hidrodesztilláció a kivitelezés módja szerint lehet vízdesztilláció (a növényi részt a vízbe teszik, és együtt melegítik), víz- és gőzdesztilláció (a növény és a víz egy edényben, de egymástól elkülönítve helyezkednek el) és gőzdesztilláció (a növényen csak a gőz halad át). Az üzemi illóolaj-előállítására általában a gőzdesztillációt alkalmazzák, leginkább ez a technológia ismert az illóolaj lepárlás néven.

Az illóolajok minősítése érzékszervi úton fizikai, kémiai módszerekkel történik. A leggyakrabban vizsgált fizikai tulajdonságok: fajlagos tömeg (sűrűség), törésmutató, optikai aktivitás, oldhatóság (70, 80, 90%-os) alkoholban (Bernáth & Németh, 2007).



1.1.1. ábra. Illóolaj kinyerése desztillációval

1.1.1.2. Illóolajok összetétele

Az illóolajok rendkívül összetettek, mivel több mint ötven alkotóelem különböző koncentrációjú keverékéből állnak. Ezért számos vegyületcsoport van jelen az illóolajokban, igen változó arányban. Az olajok elsősorban egyes növényi sejtek citoplazmájában találhatók. Többnyire néhány vegyület az elsődleges alkotóelem, amelyek 20-70%-ot tesznek ki a többi, nyomokban jelen lévő vegyülethez képest. Például az *Artemisia herba alba*-ban 24% kámfor és 57% b-tujon van, míg az *Origanum compactum*-ban 27% timol és 30% karvakrol az elsődleges alkotórészek. Ezek a különböző összetevők felelősek ezen olajok különböző antioxidáns és antimikrobiális potenciáljáért. Az erősen illékony komponensek különböző kémiai csoportokból állnak, amelyek közé tartoznak az aminok, ketonok, alkoholok, aldehidek, amidok, fenolok és terpének. Az aldehidek, alkoholok és ketonok a különböző növények és gyümölcsök különböző részeiben az aromás hatások különböző csoportjait biztosítják.

1.1.1.3. Különféle növényi illóolajok

Az illóolajok rendkívül komplex összetételűek, mivel több vegyület keverékei. Illóolajokat állítanak elő, kakukkfűolajból, kaporolajból, citromolajból, levendulaolajból, borsmentaolajból, teafaolajból, szegfűszegolajból, mustárolajból, fahéjólajból, oregánóolajból és eukaliptuszolajból. Ezek nélkülözhetetlenek a különböző betegségeket okozó mikroorganizmusok tevékenységének gátlásában betöltött szerepükben (1. táblázat). Például az illóolajokban található terpének dokumentáltan magas antimikrobiális potenciált mutatnak a *Candida glabrata*, a *C. albicans* és a *C. tropicalis* élesztőgombák esetében (Ben Hsouna és mtsai., 2017).

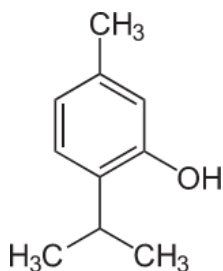
A kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) a *Lamiaceae* családba tartozik, jelentős fűszer- és gyógynövényként ismert (1.1.2. ábra). Évelő, fásodó szárú félcserje, illóolaját virágzáskor napos időben halmozza fel, fő összetevője a timol, melynek aránya általában 20-60% között van. A tudományos kutatások számos területen vizsgálták a kakukkfű illóolaj egészségügyi előnyeit és alkalmazásait. Számos tanulmány kimutatta, hogy a kakukkfű illóolaj hatékonyan leküzdheti a különféle kórokozókat, beleértve a baktériumokat és gombákat is. A timol és a karvakrol, amelyek a kakukkfű illóolajban megtalálhatók, erős antibakteriális hatást fejtenek ki és számos kórokozó ellen hatékonyak, beleértve az antibiotikumokkal szemben rezisztens baktériumokat is (Hosseinzadeh és mtsai., 2015).



1.1.2. ábra. *Thymus vulgaris* L.

Egy tudományos kutatás során a kakukkfű illóolaj potenciális antibakteriális hatását vizsgálták a nozokomiális és ételmérgezéses fertőzéseket okozó baktériumok ellen. A nozokomiális bakteriális fertőzések és az antimikrobiális rezisztencia globális egészségügyi tehernek számítanak, és hozzájárulnak a kórházi betegek magas halálozási és megbetegedési arányához. A kutatás során kimutatták, hogy a kakukkfűkivonatok erős antibakteriális hatékonyságot mutattak a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* és *Salmonella typhimurium* ételmérgezést okozó baktériumtörzsekkel szemben. A kutatás rávilágít arra, hogy a *Thymus vulgaris* kivonatok potenciális antimikrobiális hatása az érintett patogén baktériumtörzsekkel szemben kiemeli e kivonatok felhasználásának lehetőségét a természetes és biztonságos antimikrobiális szerek előállításában (Yassin és mtsai., 2022).

A kakukkfű illóolaj antibakteriális hatásának nagy része a fő alkotóelemének a timolnak (1.1.3. ábra) tulajdonítható. A timolból kereskedelmi forgalomban kapható antibiotikumokat még nem fejlesztettek ki, de az egészségügyi termékek a timolt antimikrobiális tulajdonságai miatt beépítették készítményeikbe. A timol általában biztonságosnak tekinthető a fogyasztás szempontjából, és fogászati alkalmazásokban használják őket, élelmiszer-aromaként engedélyezték, és antibakteriális adalékanyagként is figyelembe vették őket az élelmiszerekben és takarmányokban.



1.1.3. ábra. A timol szerkezete

Számos tanulmány kimutatta, hogy a timol erős antibakteriális szer mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokkal szemben. A timol antibakteriális hatását többféle mechanizmus révén fejtheti ki, többek között a sejtfal károsításával, a sejthártya permeabilitás növelésével, enzimek gátlásával és oxidatív stressz keltésével. Ezen kívül kimutatták, hogy additív vagy szinergista módon hat a hagyományos antibiotikumokkal, ami fontos az élelmiszerekben és a betegségekben előforduló baktérium-rezisztencia problémájának leküzdésében (Kachur & Suntres, 2020).

A kapor (*Anethum graveolens* L.) közismert fűszer- és gyógynövény, egyéves, kissé fásodó szárú növény (1.1.4. ábra). Virágai, magjai, levelei, termései és szára egyaránt tartalmaznak illóolajat, ami az emberi felhasználás szempontjából jelentős. Emellett a kapormagból nyert illóolajnak számos terápiás hatása is van, mint például görcsoldó, koleszterincsökkentő, gyulladáscsökkentő, antioxidáns, gombaölő, mikrobaelenes, rovarölő, rákellenes és cukorbetegség elleni hatás (Anvar és mtsai., 2023).



1.1.4. ábra. *Anethum graveolens* L.

Stanojević és munkatársai 2016-ban végzett kutatásuk során a kapor (*Anethum graveolens* L.) magjából nyert illóolaj antioxidatív és antimikrobiális aktivitását vizsgálták a természetes antioxidánsként és antimikrobiális szerként való lehetséges alkalmazása szempontjából. Az illóolaj antioxidatív aktivitásának vizsgálatára a DPPH-tesztet és a FRAP-módszert alkalmazták. Az olaj antimikrobiális hatásának vizsgálatára a következő mikroorganizmusokkal szemben a korong-diffúziós módszert alkalmazták: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* és *Candida albicans*. Az eredmények azt mutatták, hogy a kapor illóolaja jelentős antioxidáns aktivitással rendelkezik, melyet legjobban 29 mg/mL koncentrációban és 60 perc inkubációval

érték el, emellett az illóolaj kiváló antimikrobiális aktivitást mutatott, különösen hatékonyan gátolta a *Staphylococcus aureus* növekedését (Stanojević és mtsai., 2016).

A fahéjolaj erősen illékony, és a *Cinnamomum zeylanicum* leveléből, kérgéből és gyökeréből végzett extrakcióból nyerik. Három létfontosságú összetevőből áll, amelyek közé tartozik a linalool, az eugenol és a fahéjaldehid, amelyek a teljes összetétel mintegy 82%-át teszik ki. A fahéjillóolajok legaktívabb összetevője a fahéjaldehid, amely a mikrobák különböző csoportjaira gyakorolt gátló hatásaért is felelős. A teafaolajat a *Melaleuca alternifolia*-ból vonják ki, és elsősorban pinenből, terpineolból, terpinenből, cimenből és cineolból áll. Figyelemre méltó gátló hatással van különböző gombatörzsekre, valamint egyes baktériumokra és vírusokra (Chouhan és mtsai., 2017).

A levendulaolajnak erős antimikrobiális hatása van különböző antibiotikum rezisztens baktériumokra, mikroszkopikus gombákra (*Aspergillus* fajok, *Cryptococcus neoformans*). Az eukaliptuszolajok fellandralból, limonénből, szpathulenolból, globulolból, cüménből, kriptonból, pinokarvénből és terpinenből állnak. Az eukaliptuszból kivont olajokat általában természetes adalékanyagként alkalmazzák élelmiszerek ízesítésére, és alkalmasak különböző mikrobák szaporodásának gátlására is. Az eukaliptusz növények különböző fajai különböző összetételű olajokat termelnek, amelyek magas antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkeznek a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* és *Haemophilus influenzae* ellen (Inobeme & Adetunji, 2024).

1.1.1. Táblázat. Növényi eredetű anyagok által gátolt baktériumok (Hou és mtsai., 2022)

Sorszám	Növény	Gátolt baktérium
1	<i>Artemisia vulgaris</i> (Fekete üröm)	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
2	<i>Origanum vulgare</i> (Szurokfű)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Adenovirus</i>
3	<i>Thymus vulgaris</i> (Kerti kakukkfű)	<i>Escherichia coli</i>
4	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Rozmaring)	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
5	<i>Verbana officinalis</i> (Közönséges vasfű)	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Lysteria monocytogenes</i>
6	<i>Zingiber officinale</i> (Közönséges gyömbér)	<i>Enterobacteriaceae</i>
7	<i>Mentha piperita</i> (Borsmenta)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
8	<i>Salvia officinalis</i> (Orvosi zsálya)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>
9	<i>Foeniculum vulgare</i> (Édeskömény)	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus flavus</i>

1.2. Növényi eredetű anyagok hatása a baktériumokra és gyakorlati alkalmazásuk

A jelenlegi fogyasztói kereslet és a piaci trendek dinamikus változásaira reagálva az aktív csomagolás területe egyre nagyobb jelentőséggel bír. A hagyományos csomagolással ellentétben, amelynek teljesen inertnek kell lennie, az aktív csomagolást úgy tervezték, hogy kölcsönhatásba lépjen a tartalommal vagy a környező környezettel. Az aktív csomagolás az adalékanyagok beépítését jelenti a csomagolási rendszerekbe azzal a céllal, hogy fenntartsák vagy meghosszabbítsák például a hústermékek, zöldségek, gyümölcsök minőségét és eltarthatósági idejét. A tárgyalt aktív csomagolási rendszerek közé tartoznak az oxigénmegkötők, etilénmegkötők, íz- és szagelnyelők/szagfelszabadítók, antimikrobiális és antioxidáns csomagolási technológiák (Prasad & Kochhar, 2014).

A kórokozó vagy romlást okozó baktériumok okozta mikrobiológiai szennyeződés előfordulhat a nem megfelelő feldolgozás során, vagy ha a csomagolás integritása sérül a felszakadt tömítés, a lyukadás, a horpadások miatt. Az élelmiszerek, mikrobák káros hatásaitól való megóvásának hagyományos módszerei közé tartozik a hőkezelés, szárítás, fagyasztás, hűtés, besugárzás, módosított légkörű csomagolás, valamint a sók vagy antimikrobiális szerek hozzáadása. Az antimikrobiális csomagolás olyan rendszereket foglal magában, mint például a bioaktív anyagok diszpergálása a csomagolásban, bioaktív anyagok bevonása a csomagolóanyag felületére, vagy filmképző tulajdonságokkal rendelkező antimikrobiális makromolekulák vagy ehető mátrixok alkalmazása (Coma, 2008).

Számos antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkező hatóanyagot (etanol, szén-dioxid, klór-dioxid, antibiotikumok, szerves savak, illóolajok és fűszerek stb.) használnak az élelmiszerek romlásához vezető mikroorganizmusok szaporodásának gátlása céljából (a baktériumok a csomagolásokat is megtámadhatják, befolyásolva azok funkcióját és tulajdonságait). A klór-dioxid létezhet gáznemű, folyékony vagy szilárd formában, nemcsak a baktériumok és gombák, hanem a vírusok ellen is hatásosnak bizonyult. A klór-dioxid lehetséges felhasználási területei közé tartozik a hús, a baromfi, a hal, a tejtermékek, valamint az édességek és pékáruk. A szén-dioxid szerepe a csomagolás légkörében az, hogy elnyomja a mikrobák növekedését, és lelassítja a gyümölcsök és zöldségek légzési sebességét. A magas szén-dioxid-tartalom (10-80%) alkalmas élelmiszerek, például húsok és baromfi esetében a termékek felületén a mikrobák növekedésének gátlására és az eltarthatósági idő

meghosszabbítására. A mikrobák növekedésének problémáját más antimikrobiális adalékanyagok használatával is kezelni lehet. Számos tartósítószer (szorbinsav, benzoesav, propionsav és sói, vagy bakteriocinek, mint a nizin, természetes fűszerek, stb.) adnak a műanyag fóliákhoz és az antimikrobás anyagokhoz (Prasad & Kochhar, 2014).

Az illóolajok egyre nagyobb figyelmet kapnak, mint természetes adalékanyagok az élelmiszerek eltarthatósági idejének meghosszabbítására, mivel a szintetikus tartósítószer használat kockázatos. A szintetikus adalékanyagok csökkenthetik az élelmiszerek romlását, de a mai generáció egyre egészségtudatosabb, és inkább a természetes eredetű termékekben hisz, mint a szintetikusokban, azok potenciális toxicitása és egyéb aggályai miatt. Ezért az egyik legfontosabb feltörekvő technológia az illóolajok kivonása számos növényi részekből és ezek alkalmazása az élelmiszerekben. Az illóolajok jó forrásai számos bioaktív vegyületnek, amelyek antioxidatív és antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkeznek, így felhasználásuk nagyon hasznos lehet az élelmiszerek eltarthatósági idejének meghosszabbítására. Bár az illóolajok ígéretes alternatívának bizonyultak a kémiai tartósítószer helyett, speciális korlátokat mutatnak, amelyeket meg kell oldani, mielőtt az élelmiszerrendszerekben való alkalmazásuk megkezdődne. Az alacsony vízzoldhatóság, a nagy illékonyság és az erős illat a fő tulajdonságok, amelyek megnehezítik az élelmiszeripari alkalmazásokat. Jelenleg tanulmányozzák azokat a legújabb eredményeket, amelyek az alkalmazás új formáira utalnak, hogy elkerüljék ezeket a problémákat. A csomagolóanyagokban és bevonatos fóliákban, de közvetlenül az élelmiszer-mátrixba emulzióként, nanoemulzióként és bevonatként történő alkalmazásuk is az új lehetőségek közé tartozik (Fernández-López & Viuda-Martos, 2018).

Számos tanulmány dokumentálta ezeknek az illóolajoknak a hatékonyságát, mint a különböző élelmiszertermékek eltarthatósági idejének meghosszabbítására szolgáló aktív csomagolások összetevőit. Növekvő igény mutatkozik a rendkívül minimalizált tartósítószeret igénylő aktív csomagolóanyagok iránt. Különböző megközelítéseket alkalmaztak az illóolaj csomagolásban történő felhasználása során, amelyek a következők: az olaj keverése a csomagolóanyagba és az illóolaj bevonása az élelmiszercsomagolásra. A megközelítések közül a legígéretesebb az illóolajnak a csomagolóanyagba történő beépítése.

A növényi illóolajok gátló hatását is kimutatták romlást okozó és patogén baktériumok biofilm képzésére az élelmiszeripari gyakorlatban. Alkalmazzák a zöldségek és gyümölcsök betakarítás utáni tartósítására, tejipari termékek előállításánál során, takarmányok előállításánál során. Kutatási eredmények alapján egyes növényi illóolajok fokozzák a tejipari starterkultúrák tevékenységét (Inobeme & Adetunji, 2024).

1.3. Antibiotikum rezisztencia

Az antimikrobiális szereket széles körben alkalmazzák a humán- és az állatgyógyászatban a betegségek megelőzésére, valamint a fertőzések kezelésére. Túlzott használatuknak egyik következménye, hogy a mikroorganizmusokban kialakulhat az antimikrobiális rezisztencia (AMR), ami megnehezíti a betegségek és fertőzések kezelését, ami az egészségügyi komplikációk és a halálesetek növekedéséhez vezet.

Az antibiotikum rezisztencia az a képesség, amikor a mikroorganizmusok, ellenállóvá válnak az antibiotikumoknak, amelyekkel korábban hatékonyan kezelhetők voltak. Amikor egy mikroorganizmus rezisztens lesz az antibiotikumokra, az azt jelenti, hogy az antibiotikumok már nem képesek elpusztítani vagy gátolni a mikroorganizmusok növekedését és szaporodását. (Cornelius és mtsai., 2024).

Az antibiotikum rezisztencia kialakulhat természetes folyamatok során, például genetikai változások vagy mutációk révén, azonban az antibiotikumok túlzott vagy nem megfelelő használata is nagymértékben hozzájárulhat a rezisztencia kialakulásához. Például, ha valaki nem fejezi be a teljes antibiotikum-kúrát, vagy az antibiotikumokat nem írják fel megfelelően, ez lehetővé teheti a rezisztens mikroorganizmusok túlélését és szaporodását. A fertőzések az állatokkal való közvetlen vagy közvetett érintkezésből eredhetnek, beleértve az AMR-kórokozókkal, különösen baktériumokkal fertőzött állatokból származó élelmiszerek fogyasztását vagy kezelését. A legújabb adatok arra utalnak, hogy az állatoknál alkalmazott antimikrobiális szerek AMR-hez vezethetnek az olyan baktériumokban, mint az *Escherichia coli* és az *Enterococcusok*.

Az antibiotikum rezisztencia komoly egészségügyi problémát jelent világszerte, mivel nehezebbé teszi az antibiotikumokkal való kezelést, ami növeli az emberi betegségek kezelésének kockázatát és költségeit, valamint a fertőzések terjedésének veszélyét. Ezért fontos az antibiotikumok felelős és megfontolt használata, valamint az alternatív megoldások, például új antibiotikumok vagy oltások kifejlesztése a rezisztencia problémájának kezelésére (Collaborators & Pereira, 2023).

1.4. Élelmiszeripari szempontból jelentős patogén baktériumok

1.4.1. *Escherichia coli*

Az *Escherichia coli* az *Enterobacteriaceae* család tagja, amely Gram-negatív baktérium, fakultatív anaerob bacillus. Az *Escherichia coli* sejtek jellemzően 1,1-1,5 µm szélesek és 2-

6 µm hosszúak, lehetnek mozgékonyak vagy mozgásukban korlátozottak, rendszerint melegvérű állatok tápcsatornájának alsó szakaszában élnek. A legtöbb típus ártalmatlan, de vannak patogén törzsek is, amelyek az emberi szervezetben gastroenteritist, vagy akár vérzéses bélgyulladást okozhatnak (*Escherichia coli* O157:H7). A veszélytelen törzsek az emberi emésztőrendszer normál mikrobiotájához tartoznak, jelenlétük megnehezíti az egyes patogén törzsek elszaporodását a bélrendszerben, optimális növekedési hőmérsékletük 37 °C (Desmarchelier & Fegan, 2002).

1.4.2. *Bacillus cereus*

A *Bacillus cereus* Gram-pozitív, aerob vagy fakultatív anaerob, spóráképző, mozgékony, patogén és opportunistá baktérium, amely oxigén jelenlétében rezisztens endospórákat képes termelni. A *B. cereus* széles körben elterjedt a környezetben, leginkább a talajban, ahol a spórák kedvezőtlen körülmények között is fennmaradnak. A *B. cereus* széles hőmérséklet-tartományban (8-55 °C) képes növekedni, kevésbé tűri az alacsony pH-értékeket (minimum 5-6) és a víztartalmat (minimális vízaktivitás 0,95). A *B. cereus* enterotoxinokat termelhet, amelyek hányást vagy hasmenést okoznak. Az élelmiszeriparban leginkább a tejfeldolgozásnál jelenti a problémát ugyanis a nyers tej gyakran kis számban *B. cereus* spórákkal szennyezett és a spórák képesek túlélni a pasztörözést (Christiansson, 2002).

1.4.3. *Enterococcus faecalis*

Az *Enterococcus faecalis*, egy Gram-pozitív baktérium, hőálló fajok ezért pasztörözési hőmérsékleten is túlélhetnek. A legtöbb *Enterococcus* faj viszonylag ellenálló a fagyasztással szemben is. Az *Enterococcus faecalis* ellenálló különféle antibiotikumokkal szemben, és opportunistá kórokozóként betegségeket okozhat az emberben, mint például élelmiszermérgezés, húgyúti fertőzések és műtét utáni sebfertőzések (Flint, 2002).

1.4.4. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonadaceae* családba tartozó Gram-negatív, aerob pálcika alakú baktérium, gyakran megtalálható a talajban és a vízben, valamint a növényeken és az emberi szervezetben. Optimális növekedési hőmérséklete 37 °C, de akár 42 °C-on is növekszik. A *P. aeruginosa* rezisztens a magas sókoncentrációval, a gyenge antiszeptikumokkal és számos általánosan használt antibiotikummal szemben. A *P. aeruginosa* a fertőzés kialakításához kihasználja a gazdaszervezet védekezésének gyengeségeit, fertőzést okoz a húgyutakban, a légzőrendszerben, a bőrben, a csontokban, ízületekben, a gyomor és bélrendszerben, valamint a vérben (Wu és mtsai., 2015).

1.4.5. *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* fakultatív anaerob, Gram-pozitív 0,5-1,0 µm átmérőjű humánpatogén baktérium, amely antibiotikum rezisztens, gyakran megtalálható a légutakban és a bőrön, valamint enterotoxinokat képes termelni, amelyeknek köszönhetően ételmérgezést is okozhat. A szervezetbe jutás módja a bőr vagy a nyálkahártya megsérülése révén, valamint a fertőzött élelmiszer száján át történő lenyelésével (Asperger & Zangerl, 2002).

1.4.6. *Salmonella* spp.

A *Salmonella* spp. az *Enterobacteriaceae* családba tartozó pálcika alakú Gram-negatív baktériumok. A *Salmonella* baktériumok nem spóráképzők, túlnyomórészt mozgékonyak, amelyek sejtátmérője körülbelül 0,7 és 1,5 µm között van, hossza 2 és 5 µm. Széles hőmérsékleti tartományban képesek a túlélésre, a legtöbb emberi megbetegedést a *Salmonella enterica* alfajhoz tartozó baktériumok okozzák. A *Salmonella* számos állat, például tehenek, kutyák, sertések és madarak bélrendszerében él, de a *Salmonella typhi* csak az ember bélrendszerében fordul elő. A *Salmonella* a világon az élelmiszer eredetű megbetegedések egyik leggyakoribb okozója, köztük a baromfi és a tojás továbbra is az élelmiszer eredetű szalmonellózis kiemelkedő forrásai (Poppe, 2002).

1.5. Mikroszkopikus gombák

A *Saccharomyces cerevisiae*, más néven sörélesztő vagy pékélesztő, egy egysejtű gombafaj, ez a leggyakrabban használt élesztőgomba a biokémiai kutatásokban, a kenyérgyártásban és a sörgyártásban is kiemelkedő szerepet játszik. A *S. cerevisiae* széles körben előfordul az élelmiszerekben, de ritkán jelölik meg a romlás okozójaként. Elsősorban a magas cukortartalmú élelmiszerek és italok fermentatív romlásában játszik szerepet, mert akár 15%-os etanol-koncentrációt is elvisel. A *S. cerevisiae*-t tejtermékekből, többek között tejből, joghurtokból és sajtokból, erjesztett zöldségekből és minimálisan feldolgozott növényi termékekből is izolálják (Stewart, 2014).

Az *Aspergillus niger* széles körben elterjedt a természetben, és gyakran megtalálható a talajban, a levegőben, az élelmiszereken és a szerves anyagokon. Az *A. niger* fekete színű spóratömegeiről könnyen felismerhető, ezért gyakran fekete penésznek is nevezik (Dong & Pan, 2023).

Az *Aspergillus flavus* egy mikroszkopikus gombafaj, amely a természetben széles körben elterjedt, és gyakran megtalálható a talajban, a levegőben, az élelmiszereken és a szerves

anyagokon. Jellegzetes sárga-zöld színű spóratömegeiről könnyen felismerhető, ezért sárga penészeknek is hívják. Egyes terményeknek a mérgező és rákkeltő aflatoxinokkal való szennyezettsége komoly aggodalomra ad okot a mezőgazdaság, valamint az állati és emberi egészség szempontjából (Bhatnagar és mtsai., 2014).

Az *Aspergillus ochraceus* az *Aspergillus* nemzetséghez tartozó penészgomba faj, amely az ochratoxin A toxint, az egyik leggyakoribb élelmiszer-szennyező mikotoxint termeli. Az ochratoxin A szennyezheti a gabonaféléket, a kávé, a kakaót, a szőlőt és a szárított gyümölcsöket, és súlyos egészségügyi problémákat okozhat, beleértve a vesekárosodást, a veseelégtelenséget és a rákot (Hocking, 2006).

A *Penicillium citrinum* megtalálható a környezetben, beleértve a talajt, a növényeket és az élelmiszereket. A citrinint először 1931-ben azonosították, mint a *P. citrinum* penészgombák által termelt másodlagos metabolitot. Bakteriosztatikus és baktericid hatású, és új antibiotikumnak ígérkezett, amíg fel nem fedezték nefrotoxikus tulajdonságait ami a mikotoxinok közé való besorolásához vezetett. A citrinin számos egészségügyi problémát okozhat, ha az élelmiszerekben jelen van, és hosszú távon fogyasztják (Litoriya & Modi, 2021).

A *Penicillium expansum* egy pszichrofil penészgomba, amely világszerte elterjedt a talajban. Az alma egyik legelterjedtebb és gazdaságilag legkárosabb betakarítás utáni betegségét, a kékpenészes almát okozza. A *P. expansum* a patulin nevű rákkeltő anyagcsereterméket termeli, amely egy idegméreg, és fogyasztása esetén káros. A patulint a gomba virulencia faktorként termeli, miközben megfertőzi a gazdaszervezetet. A patulin különösen a kisgyermekes esetében jelent egészségügyi problémát, akik gyakran nagy mennyiségben fogyasztanak almatermékeket (Lončarić és mtsai., 2021).

2. Anyag és módszertan

2.1. A kakukkfű illóolaj, kapor illóolaj és a timol antimikrobiális hatásának vizsgálata

A kutatás során a kereskedelembe forgalmazott kakukkfű illóolaj, kapor illóolaj, valamint a timol antimikrobiális hatását vizsgáltuk agardiffúziós módszerrel törzsgyűjteményből származó baktériumok *Escherichia coli* B.00200, a *Salmonella enterica* B.00834, a *Pseudomonas aeruginosa* B.01064, a *Staphylococcus aureus* B.01055, az *Enterococcus faecalis* B.01054 és a *Bacillus cereus* B.00076 esetében. Nutrient táptalaj felületére 0,1 ml baktérium szuszpenziót szélesztettünk, majd a táptalajba készített lyukakba 0,1 ml-t pipettáztunk a vizsgált illóolajból, valamint a különböző koncentrációjú timol oldatokból. Az illóolajok és a timol esetében egyaránt meghatároztuk a minimális gátló koncentrációt. Az inkubálás 37 °C-on történt 24 óráig. A kakukkfű-kapor illóolaj kombináció hatását is vizsgáltuk (1:1 arányban) a baktériumok esetében.

A kakukkfű és kapor illóolaj hatását a *Saccharomyces cerevisiae* Y.00481 élesztőgomba, valamint az *Aspergillus flavus* F.00048, *A. ochraceus* F.00850, *A. niger* F.00071, *Penicillium expansum* F.00601 és *P. citrinum* F.00815 penészgombák esetén vizsgáltuk. Az inkubálás 30 °C-on történt 5 napig.

A vizsgálatok során háromszoros ismétlést végeztünk. Az inkubálás után lemértük a kialakult gátlási zónák méretét és mm-ben fejeztük ki, meghatározva a szórás értékét is. Az illóolajok hígítása céljából etanolt használtunk, melynek az antibakteriális hatását is meghatároztuk a vizsgált baktériumok esetében. Az agardiffúziós módszert alkalmazva az etanol hatására nem alakultak ki gátlási zónák a vizsgált mikroorganizmusok esetében.

2.2. A vizsgált baktériumok antibiotikum rezisztenciájának a meghatározása

A kiválasztott baktériumok antibiotikumokkal szembeni ellenállóképességének kimutatását agardiffúziós módszerrel végeztük antibiotikum korongok segítségével a következő antibiotikumokra: sztreptomycin (S10), ampicillin (AMP10), kanamicin (K30), gentamicin (GEN10), tetraciklin (TE10), tobramicin (TOB10), erithromicin (E10), és kloramfenikol (C10). Az inkubálást követően lemértük a gátlási zóna átmérőjét és a leolvasott eredményeket az EUCAST (Antimikrobiális Érzékenységi Vizsgálatok Európai Bizottsága) ajánlásainak megfelelően értékelünk ki. A vizsgálatok során háromszoros ismétlést végeztünk.

2.3. Az illóolajok hatása és az antibiotikum rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata

Azon baktériumok esetében, amelyek az antibiotikum rezisztencia vizsgálati eredményeinek a kiértékelését követően rezisztensnek bizonyultak az adott antibiotikumokkal szemben további stresszhatásnak tettük ki illóolaj tartalmú és timol tartalmú táptalajon. A vizsgált baktériumok friss 24 órás tenyészeiből készült szuszpenzióból leoltottuk külön-külön kakukkfű illóolaját tartalmazó táptalaj felületére szélesztéssel, kapor illóolajt tartalmazó táptalajra, valamint timol tartalmú táptalajra. Az illóolajok esetében 20 ml steril 50 °C-os Nutrient táptalajhoz 0,2 ml illóolajat, valamint 0,02 ml illóolajat adagoltunk, alaposan összekevertük. A timol vizsgálata során 0,02 g timolt adagoltunk 20 ml táptalajhoz. Az inkubálás 37 °C-on történt 24 óráig, valamint 48 óráig. Ezt követően a 24 órás, majd a 48 órás tenyészetekből melyek az illóolaj, valamint a timol tartalmú táptalajokon fejlődtek baktérium szuszpenziót készítettünk és 0,1 ml-t szélesztettünk steril Petri csészékbe kitöltött és megszilárdult Nutrient táptalaj felületére. Ráhelyeztük az antibiotikum korongokat és 24 órás 37 °C-os inkubálást követően a kialakult gátlási zónák mérete alapján kiértékeljük az eredményeket az EUCAST javaslatai alapján és összehasonlítottuk a stresszhatás nélküli eredményekkel.

3. Eredmények értékelése

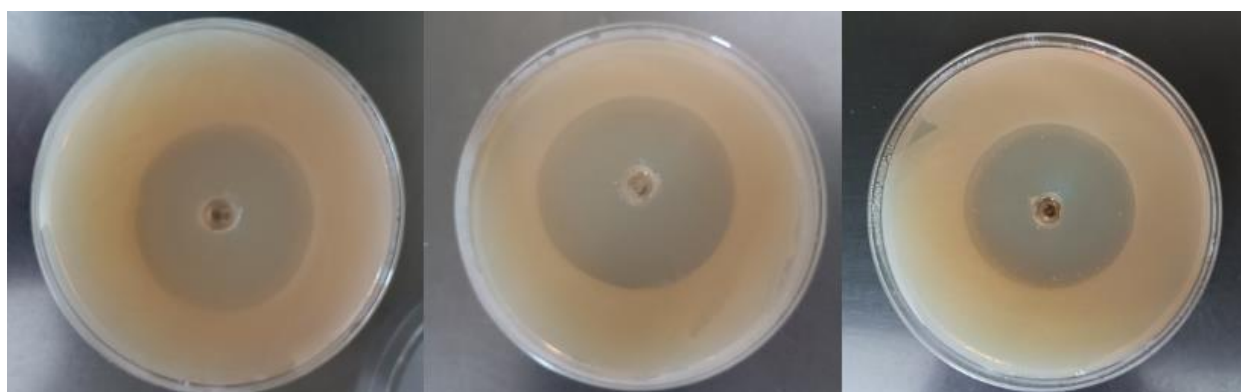
3.1. Kakukkfű és kapor illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálati eredményei

A kakukkfű illóolaj és különböző koncentrációi hatásosnak bizonyultak, mint a Gram-pozitív, mint a Gram-negatív baktériumok esetében.

3.1.1 Táblázat. A kakukkfű illóolaj hatására kialakult gátlási zónák (mm±S.D.)

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Tömény kakukkfű illóolaj	10,10±0,87	17,10±2,60	16,80±3,82	9,10±0,73	12,20±2,39	14,90±6,83
90%-os kakukkfű illóolaj	16,20±2,29	16,30±1,56	15,10±1,52	4,80±1,47	9,80±4,36	17,20±3,01
80%-os kakukkfű illóolaj	14,00±3,59	16,50±3,40	12,70±2,11	5,90±1,72	9,20±0,78	16,10±2,02
70%-os kakukkfű illóolaj	13,00±1,63	16,00±1,88	10,10±1,28	2,80±0,91	7,70±1,15	17±2,49
60%-os kakukkfű illóolaj	15,50±6,80	15,60±1,88	17,00±2,10	5,20±1,68	19,60±0,96	19,40±3,02
50%-os kakukkfű illóolaj	14,90±3,63	15,80±5,11	16,00±4,32	3,10±0,52	17,60±0,26	16,80±3,91
40%-os kakukkfű illóolaj	11,00±1,56	19,90±3,50	23,80±1,03	7,40±1,50	18,40±2,54	11,00±1,56
30%-os kakukkfű illóolaj	19,10±3,38	21,80±1,81	22,90±2,13	7,30±5,27	14,50±3,92	18,00±3,01
20%-os kakukkfű illóolaj	16,10±2,84	20,80±2,14	21,60±1,71	5,80±2,48	16,90±2,84	15,10±5,04
10%-os kakukkfű illóolaj	10,30±3,23	19,70±2,75	10,50±2,59	4,70±0,94	10,80±2,14	8,00±3,05
5%-os kakukkfű illóolaj	9,80±3,52	12,40±2,01	11,40±1,07	3,80±1,39	6,20±2,04	9,70±2,66
1%-os kakukkfű illóolaj	4,00±1,69	4,00±1,82	3,40±1,57	2,10±0,87	3,20±1,54	5,20±1,98
0,5%-os kakukkfű illóolaj	2,90±2,02	2,40±0,69	2,70±0,94	1,90±1,10	3,50±1,08	3,10±0,73
0,1%-os kakukkfű illóolaj	1,30±0,48	0,90±0,21	0,80±0,25	1,40±0,51	2,50±0,70	1,40±0,51
0,05%-os kakukkfű illóolaj	1,00±0,40	0,75±0,26	0,50±0,35	0,85±0,24	1,20±0,42	1,10±0,31

A leghatékonyabb gátló hatás a *Staphylococcus aureus* baktérium esetében volt megfigyelhető, továbbá szintén hatékony gátlási zónák alakultak ki a *Bacillus cereus* és a *Salmonella* baktériumok esetében (3.1.1. ábra). A kakukkfű illóolaj kevésbé bizonyult hatékonynak a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium esetében ahol a legnagyobb gátlási zóna a tömény kakukkfű illóolaj esetében 9.1 mm volt (3.1.1 táblázat). A minimális gátló koncentráció a vizsgált baktériumok esetében 0,04 és 0,03%.

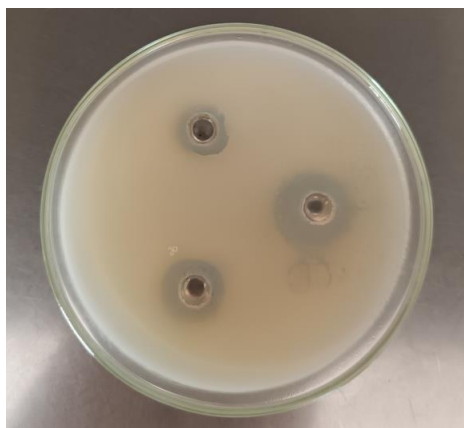


3.1.1. ábra. A 70%-os, 80%-os és 90%-os kakukkfű illóolaj hatására kialakult gátlási zónák a *Salmonella* baktérium esetében

A kapor illóolaj kevésbé bizonyult annyira hatékonynak mint a kakukkfű illóolaj, ebben az esetben a *Pseudomonas aeruginosa* és az *Enterococcus faecalis* baktériumokra nem volt semmilyen hatással, míg 50%-os koncentráció alatt már a többi baktériumra sem gyakorolt nagyobb mértékű gátló hatást (3.1.2 táblázat, 3.1.2 ábra).

3.1.2 Táblázat. A kapor illóolaj hatására kialakult gátlási zónák (mm±S.D.)

Vizsgált baktérium	Tömény kapor illóolaj	90%-os kapor illóolaj	80%-os kapor illóolaj	70%-os kapor illóolaj	60%-os kapor illóolaj	50%-os kapor illóolaj
<i>Escherichia coli</i>	7,40±1,89	2,20±0,63	1,80±0,56	1,70±0,82	2,40±1,14	1,80±0,63
<i>Bacillus cereus</i>	7,80±2,78	3,40±1,57	1,90±0,87	1,50±0,52	2,50±0,84	1,60±0,69
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,60±1,17	3,00±0,81	2,80±1,01	2,50±0,70	Nincs gátlás	Nincs gátlás
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás
<i>Enterococcus faecalis</i>	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás
<i>Salmonella enterica</i>	9,40±1,54	7,40±3,56	2,70±1,15	Nincs gátlás	Nincs gátlás	Nincs gátlás

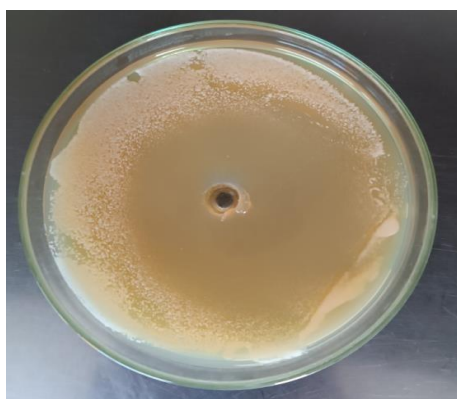


3.1.2 ábra. A 60%-os kapor illóolaj hatására kialakult gátlási zónák a *Bacillus cereus* baktérium esetében

A kakukkfű illóolaj és a kapor illóolaj egyaránt hatékonynak bizonyult a mikroszkopikus gombák ellen, mindkét illóolaj hatékonyan gátolta a vizsgált mikotoxintermelő penészgombákat, valamint jelentős gátlási zóna alakult ki a vizsgált élesztőgomba esetében is (3.1.3 táblázat, 3.1.3 ábra).

3.1.3 Táblázat. Kakukkfű illóolaj hatására kialakult gátlási zónák mikroszkopikus gombák esetében (mm±S.D.)

Vizsgált élesztő/penészgomba	Kakukkfű illóolaj	Kapor illóolaj
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25,70±1,25	22,80±2,25
<i>Aspergillus ochraceus</i>	24,50±2,63	Teljes gátlás
<i>Aspergillus flavus</i>	Teljes gátlás	Teljes gátlás
<i>Aspergillus niger</i>	Teljes gátlás	Teljes gátlás
<i>Penicillium citrinum</i>	Teljes gátlás	Teljes gátlás
<i>Penicillium expansum</i>	Teljes gátlás	Teljes gátlás



3.1.3 ábra. Kapor illóolaj hatására kialakult gátlási zóna a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba esetében

A kutatás során a kakukkfű és a kapor illóolajok kombinációját is vizsgáltuk 1:1 arányban a baktériumokra kifejtett gátló hatás tekintetében. Az eredmények meglepő módon azt mutatták, hogy a két illóolaj keveréke gyengébb antimikrobiális hatást fejtett ki, mint amit az egyes illóolajok külön-külön produkáltak. A kapott eredmények az antagonista hatásra utalnak (3.1.4 táblázat).

3.1.4 Táblázat. Kakukkfű illóolaj és kapor illóolaj kombináció hatására kialakult gátlási zónák (mm±S.D.)

Vizsgált baktériumok	Kakukkfű+Kapor illóolaj
<i>Escherichia coli</i>	4,00±0,94
<i>Bacillus cereus</i>	11,40±4,55
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,70±2,45
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,30±2,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,20±1,13
<i>Salmonella enterica</i>	10,50±5,14

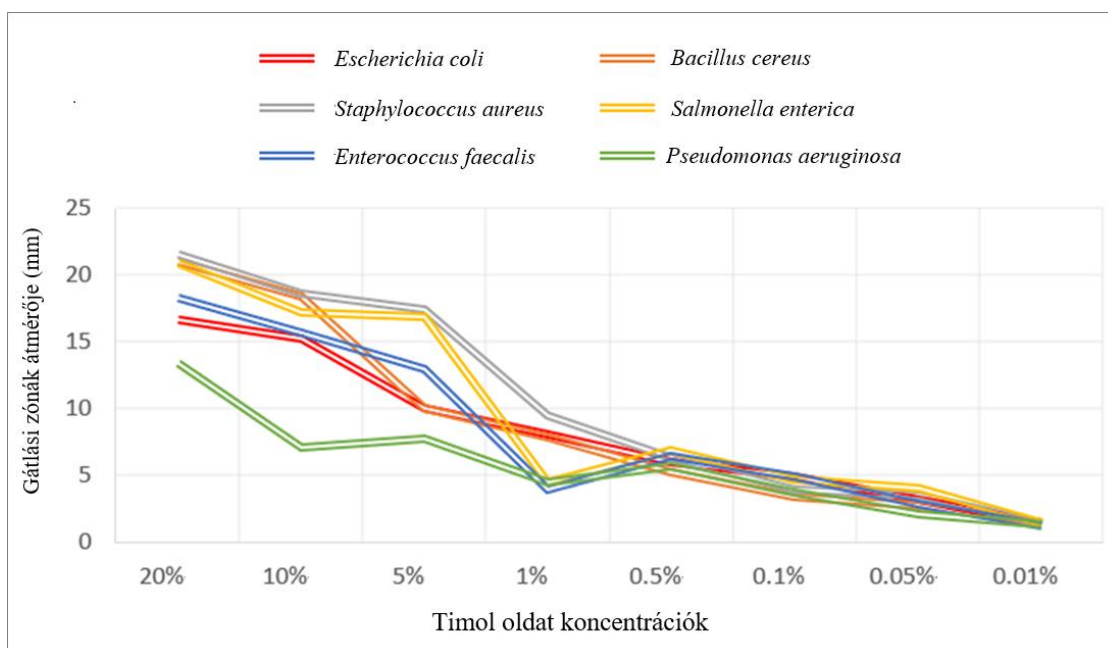
3.2. A timol antibakteriális hatásának vizsgálati eredményei

A timol hatékony antimikrobiális hatást mutatott a vizsgált mikroorganizmusokkal szemben, legjobban a *Staphylococcus aureus* baktérium ellen bizonyult hatásosnak, míg a legkisebb gátlási zónákat a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium esetében mértük (3.2.1 táblázat, 3.2.2. ábra).

3.2.1 Táblázat. A timol hatására kialakult gátlási zónák (mm±S.D.)

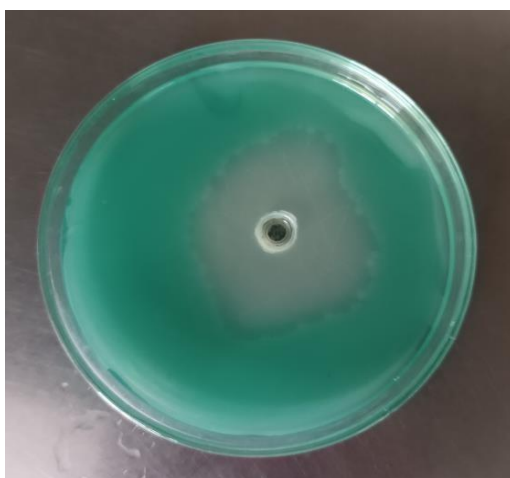
Vizsgált baktériumok	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella enterica</i>
20%-os timol	16,70±3,52	21,00±1,82	21,50±2,50	13,40±6,02	18,30±3,05	20,90±2,37
10%-os timol	15,20±2,89	18,40±2,06	18,60±2,79	7,10±5,34	15,70±5,18	17,20±4,4
5%-os timol	10,00±2,94	9,00±3,24	17,40±2,50	7,70±4,98	13,00±3,59	16,90±2,46
1%-os timol	8,10±1,52	7,90±1,52	9,50±1,40	4,50±1,43	3,90±1,52	4,50±1,43
0,5%-os timol	6,00±1,63	5,20±1,03	6,30±1,15	5,70±2,21	6,50±1,64	6,90±2,07
0,1%-os timol	4,90±1,91	3,40±0,69	4,00±1,56	3,70±1,76	4,90±1,72	4,70±0,94
0,05%-os timol	3,20±0,78	2,70±0,48	3,50±1,35	2,10±0,73	2,90±0,73	4,10±0,73
0,01%-os timol	1,40±0,69	1,20±0,67	1,50±0,52	1,30±0,48	1,20±0,42	1,20±0,42

A timol gátló hatása koncentrációtól függően változott. A legnagyobb gátlási zónákat a nagyobb koncentrációk alkalmazása során (20% és 10%) figyeltük meg, míg a legkisebb zónákat a legalacsonyabb timol koncentrációk esetén (0,05% és 0,01%) (3.2.1. ábra). A minimális gátló koncentráció a vizsgált baktériumok esetében 0,005%.



3.2.1 ábra. A gátlási zóna csökkenésének mértéke a timol koncentráció csökkenésének függvényében.

A legnagyobb gátló hatást a *Staphylococcus aureus* baktérium esetében figyeltük meg, míg a legkisebb gátlási zónák a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium esetében alakultak ki (3.2.2 ábra).



3.2.2 ábra. 20%-os timol hatására kialakult gátlási zóna a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium esetében

3.3. A vizsgált baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának vizsgálati eredményei

3.3.1 Táblázat. Antibiotikum korongok hatására kialakult gátlási zónák (mm±S.D.)

Vizsgált baktériumok	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Tobramicin	25,90±1,10	27,10±1,30	27,00±1,10	14,40±0,96	21,50±0,52	27,10±2,51
Eritromicin	10,90±0,99	25,60±0,96	Nincs gátlás	Nincs gátlás	21,70±1,05	26,10±0,73
Kloramfenikol	19,50±1,35	18,80±2,61	22,20±0,91	27,70±1,49	24,50±1,84	28,80±1,81
Kanamycin	20,50±0,84	20,70±0,67	9,20±0,63	25,10±0,73	24,50±0,52	27,40±0,94
Ampicillin	21,10±0,56	7,70±0,67	19,10±1,52	30,60±0,84	20,40±0,51	20,00±2,98
Sztreptomycin	20,00	24,2±1,22	17,1±1,59	31,80±1,81	19,80±1,81	21,70±0,82
Tetraciklin	25,50±1,08	21,6±1,95	30,40±1,71	20,70±0,67	14,80±0,91	29,20±1,03
Gentamicin	31,70±1,05	30,4±1,07	30,90±1,10	30,40±0,84	21,70±0,82	15,30±0,48

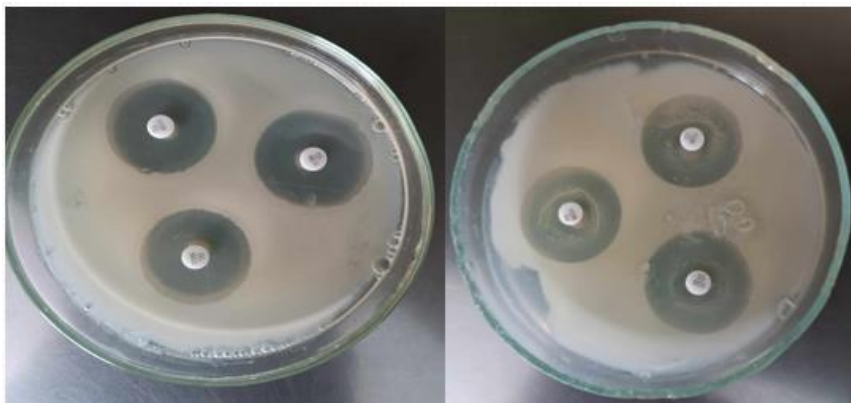
A táblázatban a gátlási zónák méreteit (mm-ben) és a standard deviációt (SD) mutatjuk be. Az eredményeket az EUCAST által meghatározott határértékek alapján S (érzékeny), I (közepesen érzékeny) vagy R (rezisztens) kategóriába soroljuk (3.3.2 táblázat).

3.3.2 Táblázat. Antibiotikum korongok hatására kialakult gátlási zónák kiértékelése az EUCAST javaslatai alapján

Vizsgált antibiotikumok	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Tobramicin	S	S	S	I	S	S
Eritromicin	R	S	R	R	S	S
Kloramfenikol	S	S	S	S	S	S
Kanamycin	S	S	R	S	S	S
Ampicillin	S	R	R	S	S	S
Sztreptomycin	S	S	S	S	S	S
Tetraciklin	S	I	S	R	I	S
Gentamicin	S	S	S	S	S	I

A vizsgált antibiotikumok közül a sztreptomycin és a kloramfenikol antibiotikum mutatta a legjobb antimikrobiális hatást, továbbá még szintén hatásosnak bizonyultak a tobramicin és a gentamicin antibiotikumok is a vizsgált baktériumok esetében (3.3.1. táblázat). A leggyengébb antimikrobiális hatás az eritromicinnek tulajdonítható, ezt követi az ampicillin és a tetraciklin.

A multirezisztencia a *Staphylococcus aureus* baktériumra volt jellemző. A *Pseudomonas aeruginosa* és az *Enterococcus faecalis* nem mutatott rezisztenciát egyetlen vizsgált antibiotikummal szemben sem.



3.2.3 ábra. Tobramicin antibiotikum hatására kialakult gátlási zónák a *Bacillus cereus* és *Staphylococcus aureus* baktériumok esetében

3.4. Kakukkfű illóolaj és kapor illóolajat tartalmazó táptalajon, valamint timol tartalmú táptalajon tenyésztett baktériumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálati eredményei

Azokat a baktériumokat, amelyek rezisztensnek bizonyultak az antibiotikumokkal szemben stresszhatásnak tettük ki, úgy, hogy különböző koncentrációkban (1%, 0,1%) kakukkfű és kapor illóolajat és timolt adagoltunk a tenyésztéshez használt táptalaj összetételébe.

3.4.1 Táblázat. Kakukkfű illóolajjal stresszelt baktériumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálati eredményei (gátlási zónák méretei mm $\pm$ S.D; besorolási kategóriák S, I, R) I.

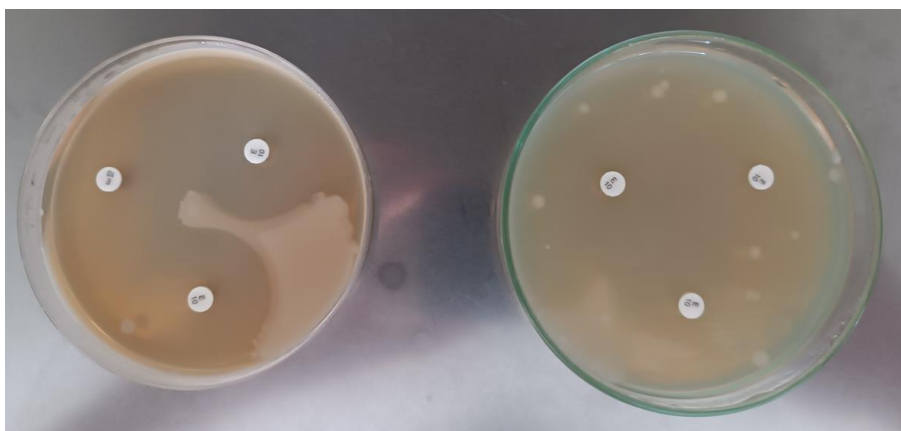
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
Eritromicin	Teljes gátlás S	33,10 $\pm$ 0,87 S	28,70 $\pm$ 2,45 S	30,80 $\pm$ 0,63 S	28,60 $\pm$ 2,22 S	31,20 $\pm$ 1,03 S		
Kanamicin	29,30 $\pm$ 1,05 S	28,10 $\pm$ 2,98 S						
Ampicillin	Teljes gátlás S	26 R					Teljes gátlás S	21,30 $\pm$ 6,73 R
Tetraciklin			27 S	Teljes gátlás S				

Az 1% kakukkfű illóolaj tartalmú táptalajon tenyésztett baktériumok esetében változás volt megfigyelhető az antibiotikum rezisztencia mértékében, ez a legtöbb esetben gyengült (3.4.1. táblázat). Például a *Staphylococcus aureus* baktérium gátlási zóna átmérője a kanamicin antibiotikum esetében 9.2 mm volt (3.3.1 táblázat) ami alapján rezisztensnek számít, a kakukkfű illóolaj stresszhatásnak kitett baktériumok esetében a gátlási zóna átmérője 29.3 mm értékre növekedett (3.4.1 táblázat), ami alapján már az S (érzékeny) kategóriába tartozik.

3.4.2 Táblázat. Kapor illóolajjal stresszelt baktériumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálati eredményei (gátlási zónák méretei mm±S.D; besorolási kategóriák S, I, R) I.

	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
Eritromicin	16,10±2,92 I	31,80±1,39 S	24,9±1,28 S	27,40±3,20 S	29,60±0,96 S	31,80±1,47 S		
Kanamicin	19,6±4,57 S	32,30±3,03 S						
Ampicillin	25,60±0,51 R	33,40±1,26 S					Teljes gátlás S	17,50±2,12 R
Tetraciklin			33,50±0,52 S	37,70±0,70 S				

Az 1% koncentrációjú kapor illóolaj szintén jelentősen csökkentette a baktériumok antibiotikum rezisztenciáját (3.4.2. táblázat, 3.4.1. ábra)



3.4.1 ábra. Eritromicin antibiotikum hatása az *Escherichia coli* baktériumra melyet kapor illóolajat tartalmazó táptalajon tenyésztettünk 24, illetve 48 óráig

Lecsökkentve a kakukkfű illóolaj koncentrációt 0,1%-ra, ebben az esetben a *Bacillus cereus* baktérium az ampicillinre rezisztens maradt, de számos baktériumnak elegendő volt ez a koncentráció is, hogy érzékeny legyen a vizsgált antibiotikumokra (3.4.3 táblázat).

3.4.3 Táblázat. Kakukkfű illóolajjal stresszelt baktériumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálati eredményei (gátlási zónák méretei mm±S.D; besorolási kategóriák S, I, R) II.

	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
Eritromicin	Teljes gátlás	35,30±2,45 S	19,10±2,96 I	31,40±3,53 S	26,60±0,50 S	30,40±3,44 S		
Kanamicin	Teljes gátlás	Teljes gátlás						
Ampicillin	Teljes gátlás	29,30±1,05 S					11,10±0,87 R	16,4±4,16 R
Tetraciklin			31,00±1,05 S	28,60±3,04 S				

A kapor illóolaj koncentrációját ugyanúgy csökkentettük, mint a kakukkfű illóolaj esetében és hasonló eredményeket kaptunk. A *Bacillus cereus* itt is rezisztens maradt az ampicillin antibiotikumra, továbbá a *Salmonella enterica* és az *Escherichia coli* eritromicinre való érzékenysége csökkent az 1%-os koncentrációjú kapor illóolaj adataihoz képest (3.4.4 táblázat).

3.4.4 Táblázat. Kapor illóolajjal stresszelt baktériumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálati eredményei (gátlási zónák méretei mm±S.D; besorolási kategóriák S, I, R) II.

	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
Eritromicin	Teljes gátlás	31,00±0,81 S	19,10±0,87 I	19,70±1,05 I	12,20±0,40 R	16,00±0,81 I		
Kanamicin	Teljes gátlás	19,60±0,84 S						
Ampicillin	-	6,70±0,82 R					7,60±1,72 R	9,50±0,52 R
Tetraciklin			27,00±2,70 S	28,30±1,49 S				

A timollal kezelt táptalaj szintén hatásosnak bizonyult a baktériumok ellen, már 0,1% koncentrációjú dózisban jelentősen megnövelte a baktériumok antibiotikumokkal szembeni érzékenységét (3.4.5. táblázat).

3.4.5 Táblázat. *Timollal stresszelt baktériumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálati eredményei (gátlási zónák méretei mm±S.D; besorolási kategóriák S, I, R)*

	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
Eritromicin	Teljes gátlás	32,60±3,51 S	20,70±0,97 I	30,30±4,76 S	20,03±0,50 I	28,20±2,25 S		
Kanamicin	Teljes gátlás	25,80±0,42 S						
Ampicillin	-	-					8,60±0,51 R	10,40±0,69 R
Tetraciklin			30,50±0,52 S	31,70±2,45 S				

4. Következtetések

- A kakukkfű illóolaj és a kapor illóolaj hatékony gátló hatást mutatott a vizsgált baktériumokkal és mikroszkopikus gombákkal szemben.
- A kakukkfű illóolaj erősebb antimikrobiális hatással rendelkezik.
- Az alacsony minimális gátló koncentráció értékek által a kakukkfű illóolaj és hatóanyaga a timol felhasználható, mint természetes tartósítószer.
- A kakukkfű illóolaj, a kapor illóolaj és a timol ígéretes alternatívát vagy kiegészítő kezelést nyújthat az antibiotikumokkal szemben rezisztens baktériumok ellen.

További célkitűzések

- A kakukkfű illóolaj, a kapor illóolaj és a timol antimikrobiális hatásának vizsgálata élelmiszerekből izolált allochton mikroorganizmusokra.
- Az izolált baktériumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata.
- Az illóolajok és a timol antibiotikum rezisztenciát befolyásoló hatásának vizsgálata izolált antibiotikum rezisztens baktériumok esetében.

5. Összefoglaló

Az illóolajok olyan koncentrált növényi kivonatok, amelyeket a növények virágai, levelei, gyökerei vagy magjai tartalmaznak. Ezek az illóolajok nem csupán az íz és illat fokozásában játszanak szerepet, hanem antimikrobiális és antioxidáns tulajdonságaik révén hozzájárulhatnak az élelmiszerek hosszabb eltarthatóságához is, ennek köszönhetően egyre szélesebb körben alkalmazzák az élelmiszerek ízesítésére, illatuk javítására és tartósítására.

A kakukkfű illóolaj és a kapor illóolaj hatékonyan gátolta a vizsgált baktériumok és mikroszkopikus gombák növekedését, kiemelve a kakukkfű illóolaj erősebb antimikrobiális hatását. Az alacsony minimális gátló koncentráció értékek alapján a kakukkfű illóolaj és a hatóanyaga, a timol, ígéretes lehetőséget kínál természetes tartósítószerként. Ezek az eredmények arra következtetnek, hogy a kakukkfű illóolaj, a kapor illóolaj és a timol potenciális alternatívát vagy kiegészítő kezelést nyújthatnak az antibiotikumokkal szemben rezisztens baktériumok ellen.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúttal megköszönöm dr. György Éva Professzornőnek a munkám elkészítésben nyújtott önzetlen segítségét.

Továbbá köszönettel tartozok az Élelmiszertudományi tanszék oktatóinak és munkatársainak, akik ezen dolgozat elkészítésében segítséget nyújtottak.

7. Szakirodalmi jegyzék

Anvar, N., Nateghi, L., Shariatifar, N., & Mousavi, S. A. 2023. *The effect of essential oil of Anethum graveolens L. seed and gallic acid (free and nano forms) on microbial, chemical and sensory characteristics in minced meat during storage at 4 °C.* Food Chemistry.

Asperger, H., & Zangerl, P. 2002. *Staphylococcus aureus*. In H. Roginski, Encyclopedia of Dairy Sciences, 2563–2569.

Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., & Hamdi, N. 2017. *Citrus lemon essential oil: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against Listeria monocytogenes inoculated in minced beef meat.* Lipids in Health and Disease, 16(1), 146.

Bernáth J., Németh É. 2007. *Gyógy- és fűszernövények gyűjtése, termesztése és felhasználása.* Budapest, Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó Kft., 62-63.

Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Moore, G. G., & Payne, G. A. 2014. *Aspergillus* | *Aspergillus flavus*. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Szerk.), Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), 83–91.

Bhavaniramya, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. 2019. *Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications.* Grain & Oil Science and Technology, 49–55.

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. 2017. *Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives.* Medicines, 4(3), 58.

Christiansson, A. 2002. *Bacillus cereus*. In H. Roginski, Encyclopedia of Dairy Sciences, 123–128.

Collaborators, A., & Pereira, M. 2023. *The burden of antimicrobial resistance in the americas.*

Coma, V. 2008. *Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products.* Meat Science, 78(1–2), 90–103.

Cornelius, A. J., Carr, S. D., Bakker, S. N., Haysom, I. W., & Dyet, K. H. 2024. *Antimicrobial Resistance in Selected Bacteria from Food Animals in New Zealand 2018–2022*. Journal of Food Protection, 87(4).

Desmarchelier, P., & Fegan, N. 2002. *Escherichia coli*, Encyclopedia of Dairy Sciences, 948–954.

Dong, H., & Pan, L.: Genome engineering in *Aspergillus niger*, Methods in Microbiology, 2023, 169–179.

Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. 2018. *Introduction to the Special Issue: Application of Essential Oils in Food Systems*, 7(4), 56.

Flint, S. 2002. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, Encyclopedia of Dairy Sciences, 904–907.

Hocking, A. D. 2006. *Aspergillus* and related teleomorphs, *Food Spoilage Microorganisms*, 451–487.

Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. 2015. *The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of Thymus vulgaris*. International Journal of Clinical Medicine, 6(9).

Hou, T., Sana, S. S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V. R., & Zhang, Z. 2022. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. Food Bioscience, 47.

Inobeme, A., & Adetunji. 2024. *Applications of Essential Oils in the Food Industry*, 1–8.

Kachur, K., & Suntres, Z. 2020. *The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60(18), 3042–3053.

Kim, S., & Fung, D. Y. C. 2004. *Antibacterial effect of water-soluble arrowroot (Puerariae radix) tea extracts on foodborne pathogens in ground beef and mushroom soup*. Journal of Food Protection, 67(9), 1953–1956.

Kumar Verma, D., Thyab Gddoa Al-Sahlany, S., Kareem Niamah, A., Thakur, M., Shah, N., Singh, S., Baranwal, D., Patel, A. R., Lara Utama, G., & Noe Aguilar, C. 2022. *Recent trends in microbial flavour Compounds: A review on Chemistry, synthesis mechanism and their application in food*, Saudi Journal of Biological Sciences, 29(3), 1565–1576.

Lin, H.-J., Lin, Y.-L., Huang, B.-B., Lin, Y.-T., Li, H.-K., Lu, W.-J., Lin, T.-C., Tsui, Y.-C., & Lin, H.-T. V. 2022. *Solid- and vapour-phase antifungal activities of six essential oils and their applications in postharvest fungal control of peach*, 156-157.

Litoriya, N. S., & Modi, A. 2021. *Chapter 8—Mycotoxin-associated food safety concerns of agriculture crops*, Food Security and Plant Disease Management, 149–169.

Lončarić, A., Šarkanj, B., Gotal, A.-M., Kovač, M., Nevistić, A., Fruk, G., Skendrović Babojelić, M., Babić, J., Miličević, B., & Kovač, T. 2021. *Penicillium expansum Impact and Patulin Accumulation on Conventional and Traditional Apple Cultivars*, 13(10), 703.

Poppe, C. 2002. *Salmonella spp*, Encyclopedia of Dairy Sciences , 2465–2470.

Prasad, P., & Kochhar, A. 2014. *Active Packaging in Food Industry*, Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, 01–07.

Saeed, F., Afzaal, M., Tufail, T., & Ahmad, A. 2019. *Use of Natural Antimicrobial Agents: A Safe Preservation Approach*.

Stanojević, L., Stankovic, M., Cvetkovic, D., Danilovic, B., & Stanojević, J. 2016. *Dill (Anethum Graveolens L.) Seeds essential oil as a potential natural antioxidant and antimicrobial agent*.

Stewart, G. G. 2014. *Saccharomyces | Saccharomyces cerevisiae*, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), 309–315.

Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*, Molecular Medical Microbiology (Second Edition) , 753–767.

Yassin, M. T., Mostafa, A. A.-F., Al-Askar, A. A., & Sayed, S. R. M. 2022. *In vitro antimicrobial activity of Thymus vulgaris extracts against some nosocomial and food poisoning bacterial strains*. Process Biochemistry, 152–159.