

THE USES OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF ESSENTIAL OILS FOR FOOD PROTECTION

VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ SILIC PŘI KONZERVACI POTRAVIN

Nedorostová L., Klouček P., Štolcová M., Kokoška L.

Katedra rostlinné výroby, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika

E-mail: nedorostova@af.czu.cz, stolcova@af.czu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to identify antimicrobial properties of essential oils in vapor phase from selected species of medicinal plants and their uses for protection foods. The essential oils, obtained from fresh plant materials by hydro-distillation, were selected according to the ethnobotanical data and their potential antimicrobial properties. The tests of antimicrobial properties were carried out by the modified dilution method for testing of essential oils in vapor phase. The tests were performed against 2 Gram-positive and 3 Gram-negative bacteria. The results were expressed as minimum inhibitory concentrations (MIC) in $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ of air. 13 of the 28 essential oils were active at least against one bacterial strain. The best results were shown by horse-radish (*Armoracia rusticana*, MIC 0.0083 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) against all of the strains, garlic (*Allium sativum*, 0,0083- 0,53 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) against all of the strains, oregano (*Origanum vulgare*, 0,066-0,13 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) against all of the strains except *P. aeruginosa*, which was not inhibited and thyme (*Thymus vulgaris*, 0,017-0,26 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) except *P. aeruginosa*, which was not inhibited.

Key words: plants, essential oils, bacteria, hydro-distillation, antimicrobial properties, minimum inhibitory concentration, vapor phase

ABSTRAKT

Cílem této studie je stanovení antimikrobiální aktivity silic v plynné fázi vybraných druhů léčivých rostlin a jejich následné využití při konzervaci potravin. Silice byly získávány z čerstvého rostlinného materiálu na základě ethnobotanických dat a jejich potenciálních možností antimikrobiální aktivity pomocí hydro-destilace. Testy antimikrobiální aktivity byly prováděny modifikovanou diskovou difúzní metodou pro testování silic v plynné fázi proti 2 Gram-pozitivním a 3 Gram-negativním potravinovým patogenním bakteriím. Výsledky byly vyjádřeny pomocí minimálních inhibičních koncentrací (MIC) v $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ vzduchu. Z 28 testovaných silic jich 13 vykazovalo antimikrobiální aktivitu minimálně proti 1 bakterii. Nejlepší výsledky byly zaznamenány u křenu selského (*Armoracia rusticana*, MIC 0.0083 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) u všech námi testovaných bakterií, česneku setého (*Allium sativum*, 0,0083- 0,53 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) u všech námi testovaných bakterií, dobromysle obecné (*Origanum vulgare*, 0,066-

0,13 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) u všech námi testovaných bakterií mimo *P. aeruginosa*, kterou neinhibovalo a tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*, 0,017-0,26 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) u všech námi testovaných bakterií mimo *P. aeruginosa*, kterou neinhiboval.

Klíčová slova: rostliny, silice, bakterie, hydro-destilace, antimikrobiální aktivita, minimální inhibiční koncentrace, plynná fáze

ÚVOD

Antimikrobiální aktivita silic byla potvrzena mnoha studii (e.g. Burt 2004; Holley and Patel 2005; Janisiewicz and Korsten 2002; Mann and Markham 1998; Tripathi and Dubey 2004), ale většina z nich byla prováděna v přímém kontaktu s mikroorganismy. Tyto metody mají však své nedostatky. Nepolární silice se špatně rozpouštějí ve vodě a proto je potřeba do živných médií přidávat různé látky jako rozpouštědla (PEG, Tween, DMSO, EtOH). Tyto látky sice mnohdy vyřeší problém rozpustnosti, ale mohou mít negativní vliv na výsledky. Testování silic v plynné fázi oproti tomu využívá jejich těkavosti a účinné látky působí na mikroorganismy přímo z plynné fáze. Nevýhodou této metody je nedostatečná těkavost účinných látek v některých silicích, tzn. že silice účinné v přímém kontaktu nemusejí disponovat stejnou aktivitou v plynné fázi.

Studie byla prováděna u relativně známých druhů siličnatých léčivých rostlin, avšak méně často používanou modifikovanou diskovou metodou pro testování látek v plynné fázi (Lopez *et al.* 2005). Z hlediska etnobotanického byly předpokládány výsledky u rostlin využívaných v lidovém léčitelství pro své antimikrobiální vlastnosti, konzervaci potravin či jako koření.

Studie byla zaměřena na potravinové patogeny, neboť i přes neustálé zvyšování hygienických norem při produkci zemědělských produktů a potravin se odhaduje, že cca. 30% obyvatel vyspělých zemí trpí každoročně chorobami přenášenými potravou. Současně ve vyspělých zemích roste poptávka po tzv. zelených potravinách obsahujících méně syntetických látek při současném zvýšení jejich bezpečnosti, kvality a trvanlivosti (Bautista-Banos *et al.* 2006). Jednou z možností, jak vyhovět těmto požadavkům, je využití silic léčivých a kořeninových rostlin jako antimikrobiálních prostředků při výrobě, skladování a zpracování zemědělských produktů a potravin (Burt 2004).

Cílem této studie je stanovení antimikrobiální aktivity siličnatých léčivých rostlin s důrazem na jejich aktivitu v plynné fázi a potvrzení hypotéz o antimikrobiální aktivitě silic léčivých rostlin vycházejících jak z hlediska etnobotanického tak mnoha vědeckých studií.

MATERIÁL A METODY

Rostlinný materiál a izolace silic: Kriterium pro výběr rostlinného materiálu bylo jeho užití v indikacích, které přítomnost antimikrobiálních vlastností naznačují (využití při konzervaci potravin, jako koření či ochucovadla). Také byly vybírány rostliny, u nichž byl

předpokládán obsah těkavých látek disponujících antimikrobiální aktivitou. Silice byly získávány pomocí hydro-destilace v Clavengerově přístroji z čerstvých rostlin, při jejichž sběru byla zaznamenána teplota, hodina, datum a momentální počasí.

Následovalo nasekání 300g čerstvého rostlinného materiálu pomocí nožového mlýnku a jeho vložení do skleněné 4 litrové baňky. Rostlinný materiál byl poté zalit 1500 ml destilované vody a přiveden k varu. Působením vysoké teploty se oddělily silice, které byly unášeny vodní parou. Po ukončení hydro-destilace, která probíhala 3 hodiny, byla silice odebrána a změřeno její množství.

Mikrobiální kultury: Pro námi prováděné testy antimikrobiální aktivity byly vybrány následující potravinové patogeny: Gram-pozitivní bakterie *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a Gram-negativní bakterie *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*. Pro přípravu inokula byly bakterie kultivovány po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C v tekutém mediu Muller-Hinton (MH).

Testovaný materiál: Česnek setý - *Allium sativum* L. (Alliaceae), fenýkl obecný - *Foeniculum vulgare* Mill. (Apiaceae), řebříček obecný - *Achillea millefolium* L., pelyněk pravý - *Artemisia absinthium* L., pelyněk estragon - *Artemisia dracunculus* L., pelyněk černobýl - *Artemisia vulgaris* L. (Asteraceae), křen selský - *A Armoracia rusticana* Gaertn. Mey. & Scherb. (Brassicaceae), třezalka tečkovaná - *Hypericum perforatum* L. (Clusiaceae), marulka šantovitá - *Calamintha nepeta* Savi, yzop lékařský - *Hyssopus officinalis* L., levandule lékařská - *Lavandula angustifolia* Mill., máta peprná - *Mentha x piperita* L., máta huňatá - *Mentha villosa* Huds., šanta kočičí - *Nepeta x faassenii* Bergmans, šanta velkokvětá - *Nepeta grandiflora* Benth., bazalka pravá - odrůda „Bílá vysoká“ - *Ocimum basilicum* var. „Grant verte“ L., bazalka pravá - odrůda „Purpurový opál“ - *Ocimum basilicum* var. „Purple opal“ L., majoránka zahradní - *Origanum majorana* L., dobromysl obecná - *origanum vulgare* L., perovskie lebedolistá - *Perovskia atriplicifolia* Benth., šalvěj lékařská - *Salvia officinalis* L., saturejka horská - *Satureja montana* L., mateřídouška vejčitá - *Thymus pulegioides* L., mateřídouška úzkolistá - *Thymus serpyllum* L., tymián obecný - *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), routa horská - *Ruta montana* Mill. (Rutaceae), ořeckřídlec klandonský - *Caryopteris x clandonensis* Hort. (Verbenaceae)

Antimikrobiální testy: Testy antimikrobiální aktivity byly provedeny *in vitro* modifikovanou diskovou metodou pro testování látek v plynné fázi. Do umělohmotných Petriho misek a zároveň do jejich víček bylo nalito dohromady 20 ml MH agaru. Ve víčkách Petriho misek byl agar pečlivě rozlit po celé ploše víčka tak, aby mohl být později přitisknut k misce, kterou pak hermeticky uzavřel. Byl kladen důraz na to, aby byl agar rozlit po celém povrchu víčka a nedocházelo tak k unikům silic v plynné fázi z misky ven.

Po zatuhnutí agaru byla každá miska inokulována 10 µl bakteriální suspenze o hustotě 10⁷ CFU/ml. Poté byl do víčka každé misky vložen disk, na který byla nanášena konkrétní koncentrace jednotlivých silic. Testování bylo provedeno v 8 koncentracích v polovičním ředění od 0,53 do 0.0083 µl/cm³ vzduchu.

Následně byla Petriho miska neprodyšně uzavřena víčkem a vložena do kultivátoru, kde byla ponechána 18 hodin při teplotě 37°C. Po vyjmutí Petriho misek z kultivátoru bylo provedeno oční vyhodnocení.

VÝSLEDKY

Z uvedených výsledků (tab.č.1) vyplývá, že co se týče sledovaných potravinových patogenních bakterií, je vůči antimikrobiálním účinkům rostlinných silic nejcitlivější *Staphylococcus aureus*, dále pak *Eschericia coli*, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella enteritidis*. Naopak nejvyšší rezistenci vykazuje *Pseudomonas aeruginosa*.

Aplikováno bylo 28 druhů rostlinných silic v koncentracích od 0,53 do 0.0083 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ vzduchu. Z toho 15 druhů nejevilo žádnou antimikrobiální aktivitu ani v námi testované nejvyšší koncentraci.

Nízkou antimikrobiální aktivitu vykazují silice *Caryopteris x clandonensis*, *Hyssopus officinalis*., *Mentha villosa*, *Nepeta x faassenii*, *Ocimum basilicum* var. "Grant verte" které v koncentraci 0,53 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ inhibovali pouze *S. aureus*, přesto se dá u těchto silic o antimikrobiální aktivitě hovořit a je předmětem dalšího zkoumání. *Origanum majorana* kromě *S. aureus* v koncentraci 0,53 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ inhibuje i *E. coli* a to v koncentraci 0,26 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$.

Střední antimikrobiální aktivitou vůči potravinovým patogenním bakteriím disponují *Thymus serpyllum*, *Satureja montana*, *Thymus pulegioides* a *Thymus vulgaris*, které dokáží inhibovat *S. aureus* a *E. coli* již v koncentracích 0,017-0,033 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$. Kromě *P. aeruginosa* byly ostatní testované bakterie inhibovány v koncentracích 0,26-0,53 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$, jen *Thymus serpyllum* neinhiboval *S. enteritidis* ani v námi nejvyšší sledované koncentraci.

Vysokou antimikrobiální aktivitu námi sledovaných silic má *Origanum vulgare*, *Allium sativum* a *Armoracia rusticana*. *O. vulgare* inhibuje *S. aureus* již při koncentraci 0.017 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$, *L. monocytogenes* a *E. coli* při koncentraci 0,066 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ a *S. enteritidis* při koncentraci 0,13 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$.

V koncentraci 0.0083 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ inhibuje Gram-pozitivní bakterie silice *Allium sativum* a *Armoracia rusticana*. *Armoracia rusticana* inhibuje všechny sledované potravinové patogeny při námi zvolené nejnižší koncentraci, zatímco *Allium sativum* inhibuje Gram-negativní bakterie při koncentracích podstatně vyšších (0,26-0,53 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$).

DISKUSE

Antimikrobiální aktivita silic v plynné fázi byla demonstrována v několika studiích, avšak výsledky jsou obtížně srovnatelné, neboť neexistuje standardizovaná metoda pro testování silic v plynné fázi. Antimikrobiální aktivita křenové silice, která obsahuje cca. 90% allyl izotiokyanátu, byla ověřena v plynné fázi proti *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* (Ward et al. 1998). MIC, kterých bylo dosaženo ve této studii jsou porovnatelné s našimi, přestože v ní byla k testování použita jiná modifikace této metody s větším objemem vzduchu.

Ačkoli silice *Allium sativum* a její obsahové látky (mj. allicin a jeho deriváty.) disponují antimikrobiální aktivitou (Harris *et al.* 2001), nebyly nalezeny informace o její antimikrobiální aktivitě v plynné fázi.

Inouye *et al.* (2001) testovali v plynné fázi silici tymiánu a levandule proti *S. aureus* a *E. coli*. Zatímco v případě *Thymus vulgaris* jsou jejich dosažené výsledky téměř identické s našimi (MIC 0,0125 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$), v případě *Lavandula angustifolia* byla zaznamenána také relativně vysoká aktivita proti *S. aureus* (0,1 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) na rozdíl od našich testů, v nichž silice *Lavandula angustifolia* účinná nebyla. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny rozdílným složením silice.

V testech provedených Lopezem *et al.* (2005) silice bazalky *Ocimum basilicum* nejevila v plynné fázi žádnou aktivitu proti *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* a *P. aeruginosa*. V našich testech vykazovala známky antimikrobiální aktivity var. "Grant verte", ovšem ve vyšší koncentraci než ji testovali tito autoři.

Ačkoli silice *Allium sativum* a její obsahové látky (mj. allicin a jeho deriváty.) disponují antimikrobiální aktivitou (Harris *et al.* 2001), nebyly nalezeny informace o její antimikrobiální aktivitě v plynné fázi.

U ostatních druhů, dle nám dostupné literatury, nebyla antimikrobiální aktivita silic v plynné fázi testována. Byly prováděny pouze testy antimikrobiální aktivity v přímém kontaktu. Z druhů, které v našich testech vykazaly antimikrobiální aktivitu, nebyly v literatuře nalezeny žádné výsledky testování antimikrobiální aktivity u druhů *Caryopteris x clandonensis* a *Nepeta x faassenii*.

ZÁVĚR

Zjištěné výsledky potvrdily předpokládané hypotézy o antimikrobiální aktivitě testovaných silic. Z fytochemického hlediska dosáhly výborných výsledků rostliny obsahující sирné sloučeniny (*Armoracia rusticana*, *Allium sativum*), tymol a karvakrol (*Thymus vulgaris*, *Thymus pulegioides*, *Thymus serpyllum*, *Satureja montana*, *Origanum vulgare*), což odpovídá rostlinám využívaným pro své antimikrobiální vlastnosti v lidovém léčitelství. Použitá metoda se ukázala jako vyhovující pro rychlý screening velkého počtu vzorků.

Tento screening antimikrobiální aktivity silic je prvním krokem při využívání antimikrobiálních vlastností silic při konzervaci potravin. V dalších krocích bude následovat testování antimikrobiální aktivity silic přímo na modelových potravinách.

Tab. 1 Minimální inhibiční koncentrace 28 rostlinných silic ($\mu\text{l}/\text{cm}^3$ vzduchu)

Druhy rostlin	výťažnost silic v % ČH	Gram- pozitivní		Gram-negativní		
		LM	SA	EC	PA	SE
<i>Allium sativum</i>	0.33	0.0083	0.0083	0.53	0.53	0.26
<i>Achillea millefolium</i>	0.07	-	-	-	-	-
<i>Armoracia rusticana</i>	0.03	0.0083	0.0083	0.0083	0.0083	0.0083
<i>Artemisia absinthium</i>	0.33	-	-	-	-	-
<i>Artemisia dracunculus</i>	0.90	-	-	-	-	-
<i>Artemisia vulgaris</i>	0.03	-	-	-	-	-
<i>Calamintha nepeta</i>	0.38	-	-	-	-	-
<i>Caryopteris x clandonensis</i>	0.15	-	0.53	-	-	-
<i>Foeniculum vulgare</i>	0.73	-	-	-	-	-
<i>Hypericum perforatum</i>	0.08	-	-	-	-	-
<i>Hyssopus officinalis</i>	0.16	-	0.53	-	-	-
<i>Lavandula angustifolia</i>	0.50	-	-	-	-	-
<i>Mentha piperita</i>	0.10	-	-	-	-	-
<i>Mentha villosa</i>	0.83	-	0.53	-	-	-
<i>Nepeta x faassenii</i>	0.33	-	0.53	-	-	-
<i>Nepeta grandiflora</i>	0.07	-	-	-	-	-
<i>Ocimum basilicum</i> var. "Grant verte"	0.08	-	0.53	-	-	-
<i>Ocimum basilicum</i> var. "Purple opal"	0.07	-	-	-	-	-
<i>Origanum majorana</i>	0.53	-	0.53	0.26	-	-
<i>Origanum vulgare</i>	0.80	0.066	0.017	0.066	-	0.13
<i>Perovskia atriplicifolia</i>	0.38	-	-	-	-	-
<i>Ruta montana</i>	0.13	-	-	-	-	-
<i>Salvia officinalis</i>	0.15	-	-	-	-	-
<i>Satureja montana</i>	0.28	0.26	0.033	0.033	-	0.26
<i>Thymus pulegioides</i>	0.15	0.26	0.033	0.033	-	0.26
<i>Thymus serpyllum</i>	0.27	0.53	0.033	0.033	-	-
<i>Thymus vulgaris</i>	0.23	0.26	0.017	0.033	-	0.033

LM - *Listeria monocytogenes*; SA - *Staphylococcus aureus*; EC - *Escherichia coli*; PS - *Pseudomonas aeruginosa*; SE - *Salmonella enteritidis*;
 ČH-čerstvá hmota

POUŽITÁ LITERATURA

Bautista-Banos S, Hernandez-Lauzardo AN, Velazquez-del Valle MG, Hernandez-Lopez M, Barka EA, Bosquez-Molina E, Wilson CL (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25, 108-118.

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

- Harris JC, Cottrell S, Plummer S, Lloyd D (2001) Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 282-286.
- Holley RA, Patel D (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22, 273-292.
- Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 565-573.
- Janisiewicz WJ, Korsten L (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40, 411-441.
- Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C (2005) Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6939-6946.
- Mann CM, Markham JL (1998) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84, 538-544.
- Tripathi P, Dubey NK (2004) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32, 235-245.
- Ward SM, Delaquis PJ, Holley RA, Mazza G (1998) Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roast beef by volatile horseradish distillates. *Food Research International* 31, 19-26.