

THE DYNAMIC OF MICROBIAL DEVELOPMENT IN THERAPEUTIC AGENT MADE OF ALOE

DYNAMIKA VÝVOJE MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH Z ALOE

Přichystalová J.¹, Kalhotka L.², Pellizzoni M.², Růžicková G.³

¹Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Institute of Agricultural and Environmental Chemistry, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense, 84. I-29122 Piacenza, Italy

³Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jitka@prichystal.eu

ABSTRACT

Aloe is succulent plant which is used for therapeutical impact. Aloe, with its chemical composition, can heal various skin burns and injuries, shows anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-tumorigenic effect.

Our objective was to set convenient storage on the base of growth of contaminating microflora. Therapeutical aloe agent, made by Dester Company (Italy) was provided for 47 days cultivation at two different temperatures (25 °C and 6 °C). These groups of microorganisms were monitored on set days – total counts of microorganisms, lactic acid bacteria, psychrotrophic bacteria, yeast and moulds. There were also samples which were kept closed and microbiological analyses were done after 47 day cultivation at two temperatures (6 °C and 25 °C). Microbiological analysis has revealed that therapeutical agent made of aloe can be stored at 6 °C for whole period.

Key words: aloe, microorganisms, storage, temperature, therapeutical agent

Acknowledgments: Special thanks belong to the Dester Company which funded this experiment and provided the samples.

ÚVOD

Na celém světě se vyskytuje přibližně 275 druhů aloe, nicméně pouze 3 druhy jsou komerčně využívány. Pravděpodobně nejčastějším druhem, který se vyskytuje v komerčních přípravcích, je *Aloe barbadensis* Miller známý také jako *Aloe vera*. Barva jeho trnitých listů se může lišit od zelené po šedou. Svým vzhledem aloe připomíná kaktus, ale ve skutečnosti připadá do čeledi *Liliaceae*, čímž je více podobný česneku nebo lilii. Pro aloe je typický žlutý květ (Gage, 1996).

Aloe se převážně vyskytuje v bylinné medicíně. Mnoho vědeckých studií prokazuje jeho léčivé účinky. Extrakty z aloe vera mohou být užity při léčení různých popálenin, ran, diabetu a zvýšené hladině lipidů v krvi. Tyto pozitivní účinky jsou připisovány přítomností látek jako jsou polysacharidy, antrachinony, C-glykosidy a lektiny.

U aloe je důležité rozlišovat mezi dvěma tekutinami s rozdílným působením na lidský organismus – průhledný gel a žlutý mýza vytékající z vnitřní části pokožky (Reynolds, 1999). Při produkci léčiv jsou od sebe separovány, aby se eliminoval nežádoucí dopad na zdraví.

Zeleno-žlutá mýza vytéká z pericyklických buněk a obsahuje značné množství aloinu (Langmead et al., 2004). Obsahuje antrachinony, které ve svém středu integrují molekulu antracenu. Mezi antrachinony pocházející z mýzy mohou být nalezeny aloin, barbaloin, aloe-emodin atd. Protirakovinné působení emodinu a aloe-emodinu způsobuje zejména indukce apoptické smrti nádorové buňky (Lee et al., 2001, Yeh et al., 2003). Japonský patent uvádí, že aloe-emodin pocházející z *Aloe arborescens* dokáže inhibovat mutagenezi (Inahata and Nakasugi, 1995).

Průhledný gel vytéká z parenchymatických buněk, které tvoří vnitřní část listu. Podporuje léčení, vyhlazuje a hydratuje kůži (Langmead et al., 2004; Reynolds, 1999). Nejdůležitějšími látkami gelu vykazujícími imunomodulační efekt jsou polysacharidy (Schechter, 1994). Aktivní polysacharid známý jako acetylovaná manosa nebo acemannan jsou jedněmi z nejzajímavějších látek objevených v aloe vera (Lourdes, 2008). Gel aloe působí antimikrobiálně, antifugálně, antivirovicky a antioxidačně (Klein a Penneys, 1988, Newton, 1987).

Během extrakce a výroby přípravků z aloe vera, může být gel kontaminován mikroorganismy, které jsou běžně přítomné na jeho listech (Coats, 1979). Růst a aktivita kontaminující mikroflóry může následně mít nežádoucí vliv na kvalitu a skladovatelnost konečného produktu (He et al., 2005).

MATERIÁL A METODIKA

Cílem experimentu bylo zjistit vhodné podmínky skladování léčivého přípravku z aloe. Přípravek byl dodán firmou Dester Company v Manerba del Garda (Brescia), která se specializuje v produkci aloe přípravku téměř 20 let. Rostliny, které byly využity pro výrobu přípravku byly pěstovány po tři roky ve sklenicích.

Složení aloe léčivého přípravku:

350g aloe

500g medu

50 ml alkoholu

Pro experiment byla využita plotnová metoda. Vzorky byly dodány ve 4 oddělených nádobách. Dvě sklenice byly ponechány uzavřené v termostatech a 2 sloužily k mikrobiologickým analýzám během skladování. Mikrobiologická analýza byla prováděna každý druhý den do 26. dne a každý pátý den do 47. dne skladování. Pro skladování byly vybrány dvě teploty – 6 °C prezentující teplotu v chladicím zařízení a 25 °C prezentující pokojovou teplotu.

Vzorky byly připraveny desetinným ředěním, čili 1 ml aloe přípravku byl zředěn 9 ml destilované vody. 1 ml příslušného ředění byl napipetován do petriho misky a zalit tekutým médiem viz Tab 1. Kolonie byly po uplynutí kultivační doby odečteny. Výsledky jsou vyjádřeny v koloniích tvořících jednotky na ml (KTJ/ml).

Tab. 1 Podmínky pro stanovení jednotlivých skupin mikroorganismů

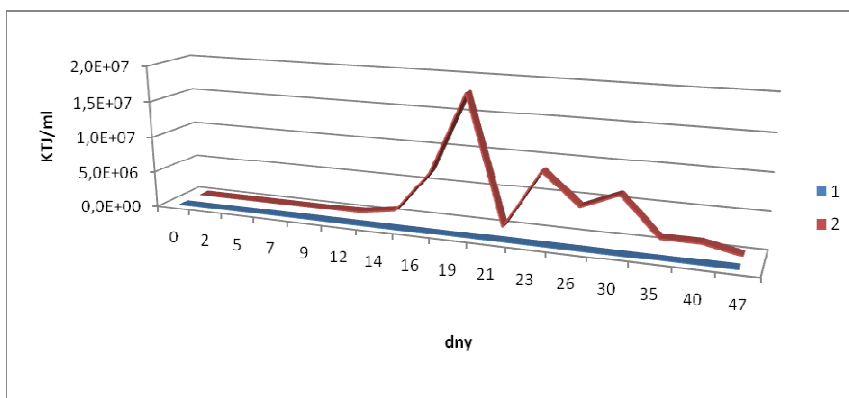
Skupiny mikroorganismů	Živné médium	Teplota kultivace	Délka kultivace
Celkový počet mikroorganismů	Plate count agar (Biokar Diagnostic, France)	30 °C	72 h
Bakterie mléčného kvašení	Meat broth rogosa (Biokar Diagnostic, France)	30 °C	72 h
Kvasinky	Medium with Chloramphenicol (Biokar Diagnostic, France)	25 °C	120 h
Plísně	Medium with chloramphenicol (Biokar Diagnostic, France)	25 °C	120 h
Koliformní bakterie	Violet Red Bile Glucose agar (Biokar Diagnostic, France)	37 °C	24 h
Psychrotrofní mikroorganismy	Plate Count Agar (Biokar Diagnostic, France)	6 °C	10 dnů

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky mikrobiologické analýzy během 47 dní

Nadzemní části rostlin jsou běžně kolonizovány různými bakteriemi, kvasinkami a mikromycetami. Zatímco některé bakterie jsou izolovány i z tkání rostlin, mnohem více mikroorganismů se nachází na povrchu listů. Nejpočetnější skupinou mikroorganismů vyskytujících se na povrchu listů jsou bakterie, v průměru se zde vyskytují až v množství $10^6 - 10^7$ (Lindow et Brandl, 2003). Při sledování celkového počtu mikroorganismů (viz Graf 1) lze s jistotou tvrdit, že pokojová teplota výrazně ovlivnila průběh rozvoje mikroflóry. U vzorku skladovaného při 25 °C se z jednotek mikroorganismů detekovaných v prvních dnech v 16. a 17. dni počet zvýšil o 7 řádů. Další dny analýz počty začaly klesat. Může to být způsobeno například vyčerpáním živin a hromaděním zplodin metabolismu mikroorganismů. Naproti tomu vzorek skladovaný při 6 °C si svou mikrobiologickou stabilitu uchoval po celou dobu skladování.

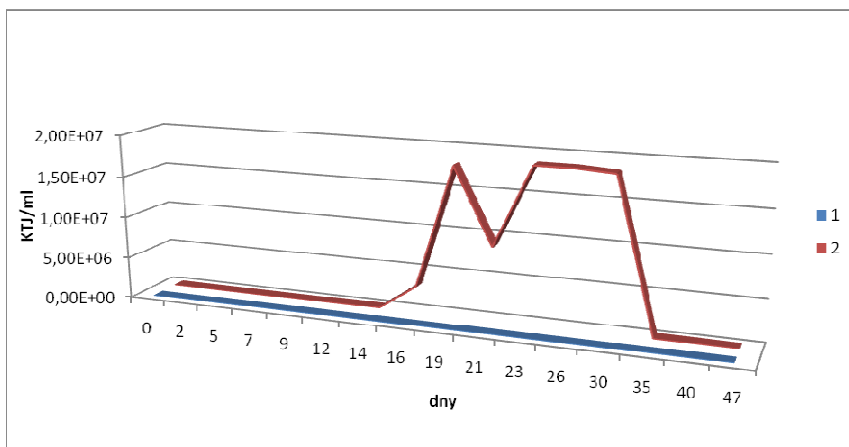
Graf 1 Celkový počet mikroorganismů během 47 dnů

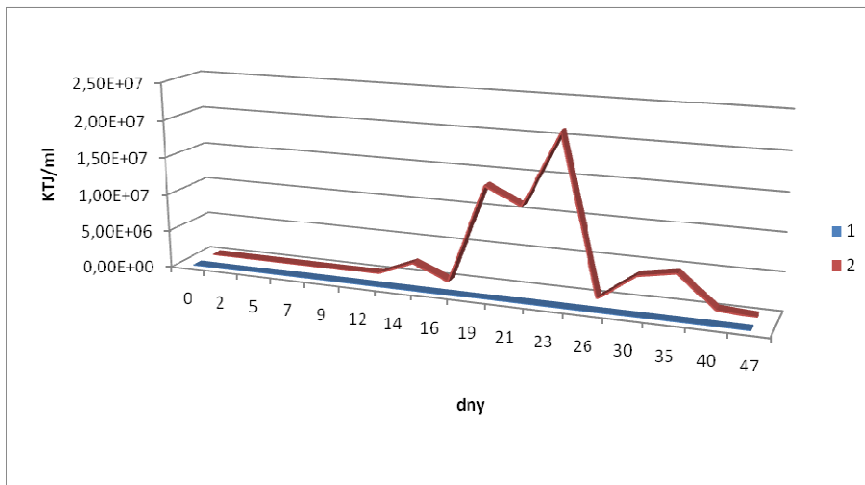


1 – vzorek skladovaný při 6 °C; 2 – vzorek skladovaný při 25 °C

Podobná situace nastala i u vývoje bakterií mléčného kvašení a kvasinek (viz Graf 2 a 3). Tyto dvě skupiny tak tvořily hlavní část všech mikroorganismů intenzivně se množících ve vzorku. Intenzivní rozvoj kvasinek při 25 °C je přičítán přítomnosti medu, který se skládá hlavně z glukosy a fruktosy a poskytuje tak kvasinkám kvalitní substrát pro jejich růst a množení. Kvasinky jsou mikroorganismy, které jsou oproti plísním poměrně aktivními obyvateli povrchu listu (Andrew et Harris, 2000). Bakterie mléčného kvašení a kvasinky dosáhly počtu až 10^7 přičemž následující dny jejich počet opět poklesl. Vzorky skladované při 6 °C vykazovaly velice nízké počty bakterií mléčného kvašení i kvasinek.

Graf 2 Počet bakterií mléčného kvašení během 47 dnů



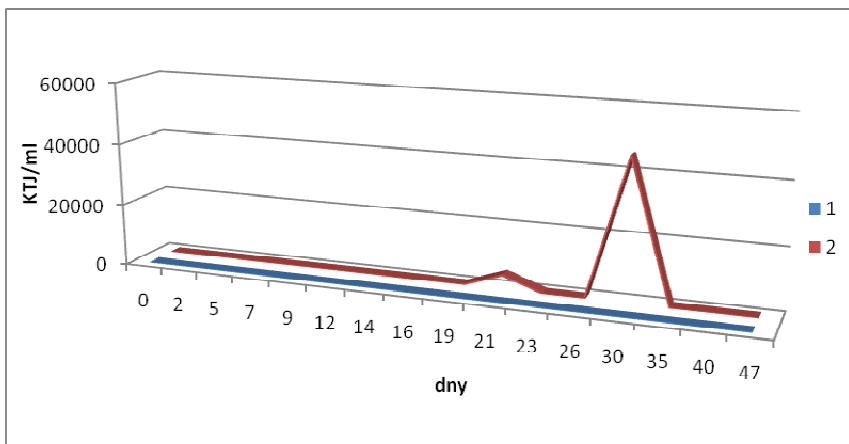


Počet psychrotrofních bakterií a plísní vzrostl u vzorků skladovaných při 25 °C jen krátkodobě viz Grafy 4 a 5. Plísně dosahovaly ve 30. dnu počtu 10^3 a psychrotrofní bakterie až 10^7 . Mezi psychrotrofní bakterie velice pravděpodobně patřily bakterie mléčného kvašení a kvasinky, které byly ve stejných dnech detekovány ve stejném množství.

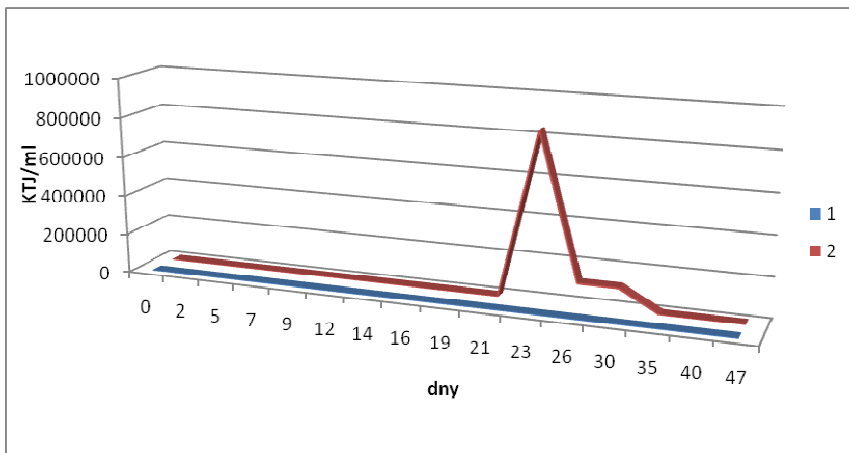
Počet plísní i psychrotrofních mikroorganismů u vzorků skladovaných při 6 °C byl detekován v řádech jednotek. Mikroskopické houby jsou považovány za přechodné obyvatelé povrchu listů a jsou zde přítomné ve formě spor (Andrew et Harris, 2000).

Koliformní bakterie nebyly v žádném vzorku detekovány. To svědčí o vysoké úrovni hygieny technologického procesu, jakým byly léčivé přípravky vyrobeny.

Graf 4 Počet plísní během 47 dnů



Graf 5 Počet psychrotrofních mikroorganismů během 47 dnů



Po uplynutí 47 dnů byly vzorky skladované při 25 °C senzoričky odlišné od vzorků skladovaných při 6 °C. Vzorky skladované při pokojové teplotě nevykazovaly znaky čerstvosti. Barva léčivých přípravků byla tmavší a vznikající oxid uhličitý způsoboval značnou perlivost přípravku. Znatelný byl i alkoholový zápach, který spolu s oxidem uhličitým byl vytvořen sacharolytickými kvasinkami. Vzorky skladované v chladicím zařízení oproti tomu nezměnily svou podobu ani vůni. Vzhledem k mikrobiální stabilitě aloe přípravků tedy lze usoudit na vhodnost skladování při teplotě 6 °C po celou dobu 47 dní.

Aloe díky své přirozené antimikrobiální aktivitě může potlačovat růst nežádoucích mikroorganismů. Spolupůsobící antimikrobiální látky, vyšší osmotický tlak způsobený přidávkem medu a přítomnost alkoholu tak mohou prodlužovat údržnost přípravku při vhodném skladování. Při různých studiích antimikrobiální aktivity aloe byly objeveny protichůdné výsledky (Reynolds, 1999). Mnohé studie potvrzují antimikrobiální aktivitu aloe proti mnohým mikroorganismům. Pro zjišťování antimikrobiální aktivity byl použit gel, míza i celý list. Aloe tak vykazovalo inhibiční efekt proti bakteriím *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *Citrobacter* sp., *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium xerose*, *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (George et Pandalai, 1949; Gottshall et al., 1949; Lorenzetti et al., 1964; Soeda et al., 1966; Bruce, 1967; Hegggers et al., 1979; Heck et al., 1981; Robson et al., 1982; Levin et al., 1988; Stuart et al., 1997). Velice podrobná studie naopak vyvrací antimikrobiální aktivitu gelu i jiných látek z povrchu listu (Fly et Kiem, 1963).

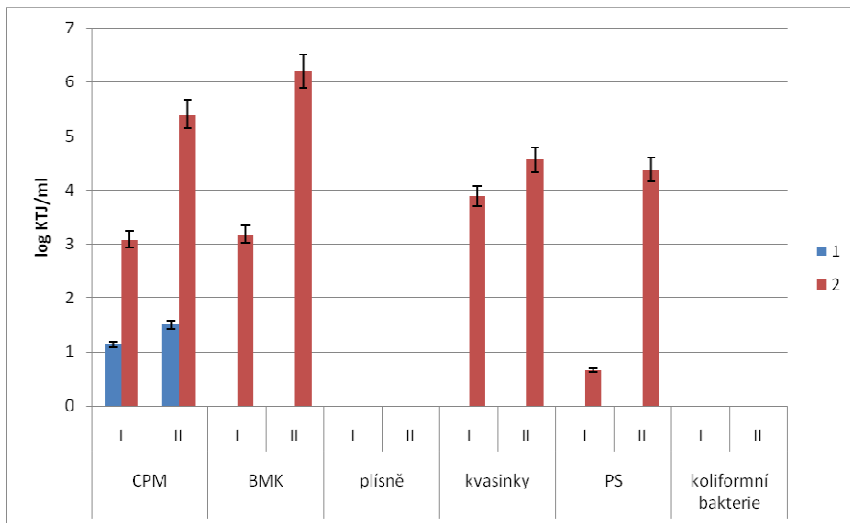
Srovnání uzavřených vzorků se vzorky používanými pro půběžnou mikrobiologickou analýzu

Po uplynutí doby 47 dnů byly uzavřené vzorky otevřeny a mikrobiologicky analyzovány. Výsledky srovnání poslední analýzy otevřených vzorků a analýzy uzavřených vzorku lze vidět v Grafu 6, kde jsou výsledky KJT uvedeny pro lepší přehlednost v logaritmické funkci.

Z Grafu 6 je patrné, že uzavřené vzorky skladované při 25 °C vykazovaly mnohem vyšší počty mikroorganismů všech skupin oproti vzorkům otevřeným. Lze to vysvětlit tím, že uzavřením vzorku byl zamezen přístup kyslíku a intenzivní růst mikroorganismů nastal mnohem později než u otevřených vzorků, kde byla většina mikroorganismů 47. den devitalizovaná vyčerpáním živin a nahromaděním zplodin metabolismu. Lze také usoudit na to, že vzorky během analýz nebyly kontaminovány a že vysoké počty mikroorganismů byly dosaženy intenzivním růstem endogenní mikroflóry.

Uzavřené vzorky skladované při 6 °C vykazovaly nepatrně vyšší počty ve srovnání s otevřenými vzorky. Rozdíl se ale pohybuje od 1 do 2 řádů celkového počtu mikroorganismů.

Graf 6 celkové srovnání otevřených a uzavřených po 47 dnech



CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, PS – psychrotrofní mikroorganismy
 I – otevřené vzorky; II – vzorky uzavřené ; I - vzorky skladované při 6 °C ; 2 - vzorky skladované při 25 °C

ZÁVĚR

Z výsledků je patrné, že celkový počet mikroorganismů byl z větší části ovlivněn počty bakterií mléčného kvašení a kvasinkami. Koliformní bakterie nebyly vůbec detekovány. Ukazuje to na vysokou úroveň technologického procesu, hygieny a eliminaci sekundární kontaminace. Teplota skladování hraje důležitou roli při skladování léčivého přípravku z aloe. Intenzivní rozvoj a změny sensorické kvality (zápach, perlivost a pravděpodobná přítomnost alkoholu vzniklého fermentací sacharidů) byly zaznamenány u všech vzorků skladovaných při 25 °C.

Z výsledků je patrné, že otevřené i uzavřené vzorky byly mikrobiologicky stabilní během 47 dnů skladování při teplotě 6 °C. Léčivý přípravek z aloe skladovaný při 25 °C se kazil mnohem rychleji, proto jeho stabilita a kvalita nemůže být zaručena.

Je přirozené, že mikrobiální stabilita záleží i na hygienických návycích konzumentů, kteří do přípravku mohou vnášet kontaminaci. Při vhodné manipulaci a skladování by se počty mikroorganismů neměly výrazně zvyšovat po celou dobu trvanlivosti výrobku.

LITERATURA

- Andrews J. H. et Harris R. F. (2000): The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces, *Annu Rev. Phytopathology* 38: s. 145 - 180
- Coats, B.C., (1979): Hypoallergenic stabilized Aloe vera gel. US Patent 4, s. 178–372.
- Gage D. (1996): Aloe vera: Nature's soothing healer, Healing Arts Press, Vermont, 119 p.
- George, M., Pandalai, K.M., (1949): Investigations on plant antibiotics, Part IV. Further search for antibiotic substances in Indian medicinal plants. *Indian Journal of Medical Research* 37, 169.
- Gottshall, R.Y., Lucas, E.H., Lickfeldt, A., Roberts, J.M., (1949): The occurrence of antibacterial substances active against *Mycobacterium tuberculosis* in seed plants. *Journal of Clinical Investigation* 28, 920–923.
- He, Q., Changhong, L., Kojo, E., Tian, Z., (2005): Quality and safety assurance in the processing of Aloe vera gel juice. *Food Control* 16, 95–104
- Heck, E., Head, M., Nowak, D., Helm, P., Baxter, C., (1981): Aloe vera (gel) cream as a topical treatment for outpatient burns. *Burns* 7, 291–294.
- Heggens, J.P., Pineless, G.R., Robson, M.C., (1979) Dermaide Aloe: *Aloe vera* Gel®: comparison of the antimicrobial effects. *Journal of American Medical Technologists* 41, 293– 294.
- Inahata K., Nakasugi T., (1995): Mutagenesis inhibitors, Japanese Patent JP 7053397
- Klein A.D., Penneys N.S. (1988): Aloe vera, *Journal of the American Academy of Dermatology* 18, p. 714–720
- Langmead L., Makins R. J., Rampton D. (1997): Anti-inflammatory effects of aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro *Drug Saf*, 17(5), p. 342-56.
- Lee H.Z., Hsu S.L., Liu M.C., Wu C.H. (2001): Effects and mechanisms of aloe emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma *Eur. J. Pharmacol.*, 431 (2001), pp. 287–295
- Levin, H., Hazenfratz, R., Friedman, J., Palevitch, D., Perl, M., (1988): Partial purification and some properties of an antibacterial compound from *Aloe bera*. *Phytotherapy Research* 2, 67–69.
- Lindow S., Brandl M., (2003): Microbiology of Phyllosphere, *Applied and Environmental Microbiology*, s. 1875 - 1883
- Lorenzetti, L.J., Salisbury, R., Beal, J.L., Baldwin, J.N., (1964) Bacteriostatic property of *Aloe vera*. *Journal of Pharmaceutical Science* 53, 1287.
- Lourdes R., Jorge R., Scott B., Dea H., Eliseo T. (2004): Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in México, *Aliment Pharmacol Ther.*, 19(5) 521-7
- Newton, L.E. (1987): On the suitability of Kenyan aloes for commercial cultivation, *East Africa Natural History Society Bulletin* 17, p. 5–8.

Reynolds T., Dweck A. C., (1999): Aloe vera leaf gel review, *Journal of Ethno-Pharmacology*, Elsevier science Ireland, p 3 – 37

Robson, M.C., Hegggers, J.P., Hagstrom, W.J., (1982): Myth, magic, withcraft or fact? Aloe vera revisited. *Journal of Burn Care and Rehabilitation* 3, 157–163.

Schechter S.R., (1994): Aloe vera:the healing plant. *Health Foods Business*, p. 23–24

Soeda, M., Otomo, M., Ome, M., Kawashima, K., (1966): Studies on anti-bacterial and anti-fungal activity of Cape Aloe. *Nippon Saikingaku Zasshi* 21, 609–614.

Stuart, R.W., Lefkowitz, D.L., Lincoln, J.A., Howard, K., Gelderman, M.P., Lefkowitz, S.S., (1997). Upregulation of phagocytosis and candidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant, acemannan. *International Journal of Immunopharmacology* 19, 75–82.

Yeh G., Eisenberg D., Kaptchuk T., Phillips R.(2003): Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes, *Diabetes Care*, 26(4) p. 1277-94.