

Alicja Synowiec¹⁾, Małgorzata Gniewosz¹⁾, Katarzyna Bączek²⁾, Zenon Węglarz²⁾

PRZECIWDROBNOUSTROJOWE DZIAŁANIE WODNO- ETANOLOWEGO EKSTRAKTU Z LIŚCI BORÓWKI CZERNICY (*VACCINIUM MYRTILLUS* L.)*

¹⁾ Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Katedry Biotechnologii,
Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik Zakładu: dr hab. S. Błażejczak

²⁾ Katedra Roślin Warzywniczych i Leczniczych
Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik Katedry: dr J. Gajc-Wolska

*W pracy przedstawiono wyniki dotyczące działania ekstraktu wodno-etanolowego z liści borówki czernicy na wybrane drobnoustroje. Ekstrakt ten wykazywał działanie hamujące na wszystkie szczepy testowanych bakterii. Najbardziej wrażliwe na jego działanie były bakterie gram dodatnie, takie jak *S. aureus* ATCC 25923 i *B. subtilis* ATCC 6633, dla których MIC i MBC wynosiły odpowiednio: 0,48 i 0,96 mg s.s./cm³ oraz 0,96 i 15,36 mg s.s./cm³. Bakterie gram ujemne hamowane były przy zastosowaniu większego stężenia ekstraktu. Badany ekstrakt nie wykazywał działania hamującego na wzrost grzybów w badanym zakresie stężeń 0,12-61,47 mg s.s./cm³.*

Hasła kluczowe: ekstrakt, (*Vaccinium myrtillus*), polifenole, aktywność przeciwdrobnoustrojowa.

Key words: extracts, *Vaccinium myrtillus*, polyphenols, antimicrobial activity.

Psucie się żywności oraz zatrucia wywoływane przez mikroorganizmy przenoszące się przez żywność nadal stanowią poważny problem dlatego poszukuje się nowych, akceptowanych przez konsumentów metod zabezpieczania żywności (1, 2). Wyciągi z roślin przyprawowych i leczniczych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych są od dawna używane do zwiększania bezpieczeństwa żywności oraz przedłużania trwałości produktów. W związku z niechęcią konsumentów do konserwantów, ekstrakty roślinne mogą stanowić doskonałą ich alternatywę. Dodatkową zaletą stosowania wyciągów roślinnych jest ich większa skuteczność dzięki kombinacji związków wchodzących w ich skład (1, 3). Do tej pory w przemyśle spożywczym z surowców roślinnych wykorzystywano takie przyprawy jak: pieprz i goździki (4), lebiodkę i szalwię (5) oraz bazylię (6).

Borówka czernica (*Vaccinium myrtillus* L.), występująca powszechnie na terenie Europy, Azji i Ameryki Północnej, należy do rodziny wrzosowatych (*Ericaceae*)

* Pracę zrealizowano w ramach projektu badawczego MNiSzW Nr N N312 068038.

(7, 8). Surowcami leczniczymi u tej rośliny są liście i owoce. Liście są bogate w garbniki, flawonoidy, antocyjany oraz kwasy fenolowe i arbutynę, natomiast owoce zawierają antocyjany (0,10-0,25%), garbniki, pektyny, witaminy oraz cukry (9). Liście borówki czernicy działają przeciwzapalne i przeciwbakteryjne i w medycynie stosowane są w leczeniu stanów zapalnych dróg moczowych i układu pokarmowego oraz pomocniczo w leczeniu cukrzycy typu drugiego. Owoce stosowane są przede wszystkim w oftalmologii jako środek poprawiający mikrokrążenie w obrębie gałki ocznej oraz jako surowiec przeciwbiegunkowy (7, 9, 10).

Celem niniejszych badań było określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych wodno-etanolowego ekstraktu otrzymanego z liści borówki czernicy.

MATERIAŁ I METODY

Surowiec do ekstrakcji, czyli liście borówki czernicy, zebrany został ze stanowiska naturalnego (las mieszany) zlokalizowanego na terenie nadleśnictwa Rudka, na Podlasiu (N 52 38.152' E 022 45.719').

Ekstrakt przygotowano metodą ekstrakcji periodycznej jednostopniowej. Jako rozpuszczalnika użyto wody destylowanej i etanolu 96%. Stosunek surowca (0,5kg) do rozpuszczalnika (5 dm³) wynosił 1:10. Rozdrobniony surowiec ekstrahowano utrzymując temperaturę 70°C przez 2 godziny. Uzyskane surowe ekstrakty przesączono przez filtr bibułowy, po czym odparowano w rotacyjnej wyparce Rotovaporator R-205 firmy Büchi. Zastosowano następującą temperaturę: łaźni grzejnej 60°C, skroplin 40°C i wody chłodzącej 20°C oraz podciśnienie 75 mbar. Ekstrakt surowy zagęszczono w wyparce do zawartości suchej masy równej 0,38 g/cm³.

W liściach i w pochodzącym z nich ekstrakcie oznaczono ogólną zawartość kwasów fenolowych i garbników metodą spektrofotometryczną wg Farmakopei Polskiej VI (11).

Badaniami mikrobiologicznymi zostały objęte następujące szczepy testowe: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus mirabilis* 14a PZH., *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145, *Penicillium expansum* ATCC 7861, *Saccharomyces cerevisiae* Bingen, *Saccharomycopsis fibuliger* E. ang. Szczepy pochodziły z Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW.

W badaniach do oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktu z liści borówki czernicy wykorzystano metodę makrorozcieńczeń (12-14). Wyznaczono minimalne stężenie hamujące oraz stężenie bójcze dla bakterii (MIC i MBC) oraz dla grzybów (MIC i MFC). Przygotowano podwójny szereg rozcieńczeń ekstraktu (0,12 do 61,47 mg s.s./cm³) w bulionie *Muller-Hinton* (Merck, Polska) dla bakterii oraz bulion *Sabourauda* (BTL, Polska) dla grzybów. Ostatecznie w każdej próbówce znajdowało się 2 cm³ podłoża z odpowiednim

stężeniem badanego ekstraktu oraz 0,1 cm³ inoculum. Inoculum wprowadzane do każdej probówki pochodziło z 18-20 h hodowli, bakterii (10⁷ jtk/ cm³) lub 48 h hodowli inoculum drożdży (10⁶ jtk/cm³). W przypadku pleśni inoculum stanowiła zawiesina zarodników przygotowana w soli fizjologicznej (10⁶ zarodników/cm³) z 21-dniowej hodowli. Inkubację prowadzono przez 18-20 h w temperaturze 37°C ± 1°C dla bakterii i 48 h hodowlę w temperaturze 28±1°C w przypadku grzybów. W przypadku pleśni *Rhizopus arrhizus* czas inkubacji wynosił 24h. Brak wzrostu szczepu był interpretowany jako przeciwbakteryjna lub przeciwgrzybicza aktywność ekstraktu. Minimalne stężenie hamujące (MIC) wyznaczano jako najmniejszą koncentrację badanego ekstraktu, który zapobiegał wizualnemu wzrostowi mikroorganizmów. Minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) lub minimalne stężenie grzybobójcze (MFC) wyznaczano posiewając 0,1 cm³ z każdej probówki, w której nie zaobserwowano wzrostu oraz z jednej probówki w której nastąpił wzrost na *Muller-Hinton* agar (BTL, Polska) dla bakterii i *Sabourauda* agar (BTL, Polska) dla grzybów. MBCs i MFCs definiowano jako najniższe stężenie ekstraktu, które powodowało redukcję liczby drobnoustrojów rzędu 99,9%.

WYNIKI

W liściach borówki zawartość kwasów fenolowych wynosiła 4,17%, a garbników 1,90%, natomiast w ekstrakcie odpowiednio: 12,10% i 6,05% (tab. I).

Tabela 1. Procentowa zawartość kwasów fenolowych i garbników w liściach i ekstrakcie z liści (%)

Table 1. Present contents of phenolic acids and tannins in the leaves and leaf extract (%)

substancja aktywna	liście	ekstrakt
	[%]	[%]
kwasy fenolowe	4,17	12,1
garbniki	1,90	6,1

W tab. II przedstawiono MIC ekstraktu z liści borówki czernicy przeciw badanym bakteriom. Ekstrakt wodno-etanolowy z liści borówki czernicy wykazywał działanie hamujące na wszystkie szczepy bakterii testowych.

Spśród badanych szczepów bakterii najbardziej wrażliwe na działanie ekstraktu były bakterie gram dodatnie. Wartości MIC ekstraktu w stosunku do *S. aureus* ATCC 25923 była najniższa i wynosiła 0,48 mg s.s./cm³. Drugą hamowaną bakterią gram dodatnią był *B. subtilis* ATCC 6633 dla którego MIC ekstraktu było równe 7,68 mg s.s./cm³. W przypadku bakterii gram dodatnich ekstrakt wykazywał też działanie bakteriobójcze. MBC było dwukrotnie wyższe niż MIC tych bakterii i wynosiło odpowiednio 0,96 oraz 15,36 mg s.s./cm³.

Tabela 11. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bójcze (MBC) ekstraktu z liści borówki przeciwko bakteriom testowym

Table 11. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of blueberry leaves extract against test bacteria

Bakterie	MIC	MBC
	[mg s.s./cm ³]	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,48	0,96
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	7,68	15,36
<i>Proteus mirabilis</i> 14a PZH	15,36	30,74
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	30,74	> 61,47
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	30,74	> 61,47

Bakterie gram ujemne hamowane były przy zastosowaniu większego stężenia ekstraktu. Spośród bakterii gram ujemnych najbardziej wrażliwy był *P. mirabilis* 14a PZH, dla którego MIC wynosiło 15,36 mg s.s./cm³ i podobnie jak w przypadku bakterii gram dodatnich MBC było dwukrotnie wyższe i wynosiło 30,74 mg s.s./cm³. Pozostałe dwa szczepy bakterii gram ujemnych *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *E. coli* ATCC 25922 były tylko hamowane przez badany ekstrakt na jednakowym poziomie MIC wynoszącym 30,74 mg s.s./cm³.

W badaniach *Witzell* i współpr. (13) w liściach borówki czernicy największy udział w kwasach fenolowych stanowił kwas chlorogenowy. *Mouning* i współpr. (13) wykazali, że najbardziej wrażliwą bakterią na kwas chlorogenowy był *S. aureus*, następnie *B. subtilis* i najbardziej oporna była *E. coli*.

Według *Cushnie* i *Lamb* (15) duża oporność bakterii gram ujemnych na kwasy fenolowe jest związana z budową ściany komórkowej, która składa się z cienkiej warstwy peptydoglikanu oraz zewnętrznej warstwy lipoprotein, liposacharydów i fosfolipidów, które skuteczniej chronią komórki przed szkodliwym działaniem kwasów. Natomiast ściana komórkowa bakterii gram dodatnich zbudowana jest z peptydoglikanu z dużą ilością porów przepuszczających te związki do cytozolu. Polifenole wnikają do wnętrza komórki przez te pory, hamują syntezę kwasów nukleinowych, uszkodzają błonę cytoplazmatyczną oraz zakłócają system energetyczny komórki. W badaniach *Kokoska* i współpr. (16) etanolowy ekstrakt z liści borówki wykazywał aktywność jedynie w stosunku do *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, dla którego wartość MIC wynosiła 250 mg s.s. / cm³. Ekstrakt ten nie wykazywał aktywności przeciwko pozostałym badanym mikroorganizmom: *Bacillus cereus*, *Candida albicans* i *Staphylococcus aureus*.

Wodno-etanolowy ekstrakt z liści borówki czernicy nie wykazywał działania hamującego na wzrost grzybów w badanym zakresie stężeń 0,12-61,47 mg s.s. / cm³ (tab. III).

Tabela III. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bójcze (MFC) ekstraktu z liści borówki przeciwko grzybom testowym

Table III. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of bluberry leaves extract against test fungi

Grzyby	MIC	MBC
	[mg s.s./cm ³]	
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	>61,47	-
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	>61,47	-
<i>Penicillium expansum</i> ATCC 7861	>61,47	-
<i>Saccharmyces cerevisiae</i> Bingen	>61,47	-
<i>Schizosaccharmyces fibuliger</i> E. ang.	>61,47	-

WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakt wodno-etanolowy z liści borówki czernicy może znaleźć zastosowanie do ograniczania zanieczyszczeń bakteryjnych, wywołanych zwłaszcza bakteriami gram dodatnimi. Badany ekstrakt nie wykazywał działania przeciwgrzybowego w użytych stężeniach (0,12 do 61,47 mg s.s./cm³).

A. Synowiec, M. Gniewosz, K. Bączek, Z. Węglarz

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF WATER-ETHANOL EXTRACT FROM THE LEAVES OF BILBERRY (*VACCINIUM MYRTILLU*)

Summary

The results of the activities of water-ethanol extract from the leaves of bilberry on selected microorganisms. This extract has shown inhibiting activity against all tested bacteria. The most sensitive to action of this extract were gram positive bacteria, such as *S. aureus* ATCC 25923 and *B. subtilis* ATCC 6633, for which the following results were obtained: MIC and MBC: 0.48 and 0.96 mg d.m. /ml also 0.96 and 15.36 mg s.s./cm³. Gram-negative bacteria were inhibited by using a higher concentration of the extract. The test extract showed no inhibitory effect on the growth of fungi in the studied concentration range 0.12-61.47 mg d.m./ml.

PIŚMIENNICTWO

1. Dupont S., Caffin N., Bhandari B., Dykes G. A.: In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. Food Control, 2006; 17: 929–932.- 2. Shan B., Cai Y., Brooks J. D., Corke H.: The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int. J. Food Microbiol., 2007; 117: 112–119.- 3. Alzoreky N.S., Nakahara K.: Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int. J. Food Microbiol., 2003; 80: 223–230.- 2. Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G.: GC–MS analysis of essential oils from Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem., 2000; 48: 2576–2581.- 3. Marino, M., Bersani, C., Comi, G.: Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. Int. J. Food Microbiol., 2001; 67: 187–195.- 4. Opalchenova G., Obreshkova D.: Comparative studies on the activity of basil-an essential oil from

Ocimum basilicum L.-against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. J. Microbiol. Methods, 2003; 54: 105–110.- 5. *Canter P.H., Ernst E.*: Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (bilberry) for night vision – a systematic review of placebo-controlled trials. Survey of Ophthalmology, 2004; 49 (1): 38-42.- 6. *Valentová K., Ulrichová J., Cvak L., Šimànek V.*: Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes, Food Chem., 2007; 101: 912-17.- 7. *Duke J.A., Bogenschultz-Godwin M.J., du Cellier J., Duke P-A. K.*: Handbook of Medicinal Herb. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton (USA), 2002; 74-76.- 8. *Ferreira F.M., Peixoto F.P., Nunes E., Sena C., Seica R., Santos M.S.*: *Vaccinium myrtillus* improves liver mitochondrial oxidative phosphorylation of diabetic Gato-Kakizaki rats. J. Med. Plant. Res., 2010; 4(8): 692-696.- 9. Farmakopea Polska VI, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa, 2002.- 10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009. Method for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guide Standard-Eight Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA.- 12. *Tamokoua J., Talab M., Wabob H., Kuiatea J, Taneb P.*: Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. J. Ethnopharm., 2009; 124: 571-575.- 13. *Witzell J., Gref R., Nashol, T.*: Plant-part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtillus*) plants. Biochem. Systemat. Ecol., 2003; 31: 115-127.- 14. *Mouming Z., Haiyan W., Bao Y., Hong T.*: Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. Food Chem., 2010; 120: 1138–1142.- 15. *Cushnie T., Lamb A.J.*: Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents, 2005; 26: 343–356.- 16. *Kokoska L., Polesny Z., Rada V. , Nepovim A. , Vanek T.* : Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. J. Ethnopharm., 2002; 82: 51-53.

Adres: 02-776 Warszawa, Nowoursynowska 159c.