

Izabela Steinka, Anita Kukułowicz¹⁾

BIOSTATYCZNE ODDZIAŁYWANIE MIAZGI I ROZTWORÓW ROŚLINNYCH NA GRONKOWCE

Zakład Higieny Żywności Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: dr hab. *I. Steinka*

¹⁾ Katedra Towaroznawstwa i Ładunkoznawstwa Akademii Morskiej w Gdyni
Kierownik: prof. dr hab. *P. Przybyłowski*

Bakteriobójcze oddziaływanie substancji zawartych w surowcach roślinnych i dodatkach stosowanych do potraw może przyczynić się znacząco do obniżenia poziomu przypadkowej reinfekcji tych produktów.

Wybrane zioła przyprawowe, warzywa i owoce często stosowane jako składniki surówek i sałatek wykazują zróżnicowaną siłę bakteriostatycznego działania w stosunku do populacji gronkowców. Surowcami roślinnymi o najwyższej dynamice obniżania liczby gronkowców są cytryna i bazylija.

Hasła kluczowe: gronkowce, hamowanie wzrostu, zioła, owoce, warzywa.
Key words: staphylococci, growth inhibitions, herbs, fruits, vegetables.

Substancje pochodzenia roślinnego stanowią uzupełniające suplementy dań wytwarzanych na drodze obróbki termicznej, jak również podawanych w stanie surowym. W skład wielu surówek i sałatek wchodzi warzywa lub owoce tropikalne. Jako dodatki lub przyprawy smakowe stosowane są często takie rośliny, jak: bazylija, oregano, mięta, oraz dodatki: cebula, czosnek i cytryna.

Warunkiem dobrej jakości potraw jest czystość mikrobiologiczna surowców, a bezpieczeństwo mogą wzmacniać fitoncydy zawarte w składnikach dań i potraw.

Z licznych danych literaturowych wynika, że wiele ziół stosowanych w gastronomii, a także przypraw zawiera znaczne ilości fitoncydów o istotnym znaczeniu biostatycznym w stosunku do bakterii saprofitycznych i patogennych (1, 3, 5, 10–14). Obecność tych substancji hamując rozwój różnych komórek Prokaryota przyczynia się do poprawy jakości higienicznej potraw i dań. Obecność w środowisku mikroflory pochodzącej od personelu może stanowić przyczynę obniżenia bezpieczeństwa serwowanych potraw. Do mikroflory, obecnej w związku z nieprzestrzeganiem zasad GHP, zależnej od postępowania i higieny personelu, należą gronkowce. Z uwagi na znaczenie higieniczne tych drobnoustrojów ocena ich przeżywalności w surowcach, półproduktach oraz gotowych potrawach jest konieczna.

Celem pracy była ocena wpływu 10% roztworów wybranych ziół oraz warzyw i owoców na populację *Staphylococcus aureus*.

MATERIAŁ I METODY

Do badań zastosowano hodowlę bulionową *Staphylococcus aureus* 25923 o inokulum 10^7 jtk/cm³. Ta wielkość inokulum była dobrana ze względu na poziom obniżający bezpieczeństwo produktów a konieczna do syntezy enterotoksyny. Inokulum potwierdzano przez posiew na podłoże Baird-Parker RPF (4).

Roztwory roślinne z następujących warzyw: cebula, pomidor i owoców takich, jak: pomarańcz, grejfrut oraz cytryna uzyskiwano poprzez homogenizację tkanki w urządzeniu Stomacher. 1 g homogenatu przenoszono do 9 cm³ soli fizjologicznej. Roztwory ziół takich jak oregano, bazylia, mięta i rozmaryn sporządzano z 1 g proszku lub liści w 9 cm³ soli fizjologicznej.

Do 9 cm³ 10% roztworów z miazgi warzyw, owoców i ziół dodawano po 1 cm³ hodowli bulionowej gronkowca. Mieszaninę gronkowca z roztworem tkanek roślin inkubowano przez 30 min. i 2 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wysiewano po 1 cm³ kolejnych rozcieńczeń i inkubowano na podłożu Baird-Parker RPF. Hodowlę prowadzono w temp. 37°C przez 48 h, a następnie oznaczano liczbę wyrosłych kolonii gronkowców.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wśród badanych ziół, bazylia wykazywała najbardziej dynamiczne działanie biostatyczne wyrażające się najwyższą redukcją gronkowców w czasie 30 min. wspólnej inkubacji.

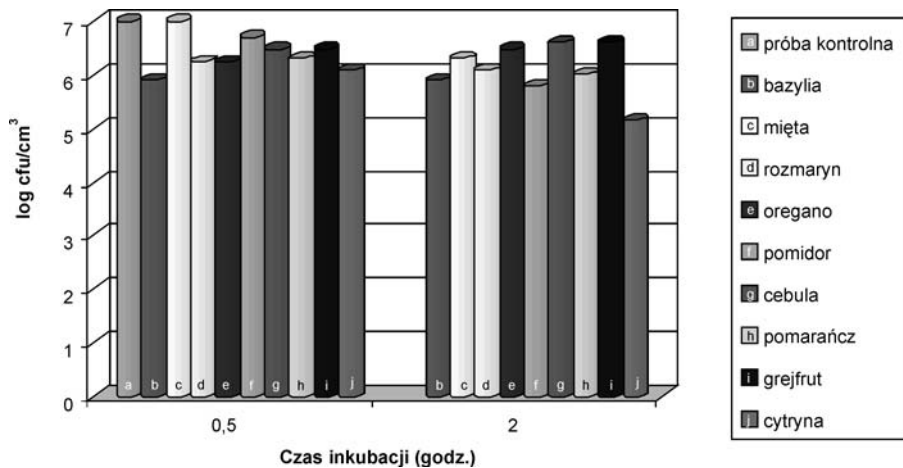
W przypadku pozostałych ziół obserwowano istotny wpływ dłuższego czasu interakcji na wielkość redukcji liczby bakterii. Różnica między liczbą zredukowanych komórek gronkowców była w przypadku mięty istotna dopiero po 2 godz. inkubacji. Intensywna redukcja gronkowców zachodziła również po 60 min. oddziaływania mięty na bakterie. Zmniejszenia liczby gronkowców w przypadku bazylii nie obserwowano natomiast w drugim etapie inkubacji z bakteriami. W pierwszym etapie interakcji między gronkowcami i ziołami obserwowano znaczącą aktywność oregano i bazylii w procesach hamowania wzrostu mikroorganizmów (ryc. 1).

Różnice w wielkościach populacji gronkowców po 30 min. oraz po 2 godz. oddziaływaniu ziół, a także dynamikę zmian przedstawiono w tab. I.

Z danych wynika, że najmniejszy stopień redukcji gronkowców po 2 godz. odnotowuje się dla mięty. Stosunkowo wysoki stopień redukcji bakterii obserwowano w obecności rozmarynu i bazylii.

Najmniejszą skuteczność w hamowaniu rozwoju populacji gronkowców stwierdzono w przypadku warzyw takich, jak: pomidor i cebula w pierwszym 30 min. okresie ich działania na mikroflorę (ryc. 1). Zmiany liczby populacji wahały się w przypadku cebuli od 0,52 do 0,4 log cfu/cm³.

Na ryc. 1 przedstawiono zmiany liczby gronkowców w obecności roztworów soków owoców cytrusowych. Najskuteczniejszym działaniem biostatycznym cechowała się cytryna, która obniżała populację gronkowców o 1,85 cfu/cm³ w czasie 2 godz. inkubacji mieszaniny, co wskazywało na znaczący wpływ czasu działania



Ryc. 1. Zmiany liczby gronkowców pod wpływem miazgi i roztworów roślinnych.

Fig. 1. Changes of staphylococci count under the influence of plant pulp and solutions.

Tabela I. Dynamika zmian liczby *Staphylococcus aureus* pod wpływem miazgi i roztworów roślinnychTable I. Influence of the plant pulp and solutions on the dynamic *Staphylococcus aureus* count changes

Rodzaj roślin	Różnica wielkości populacji między poszczególnymi czasami (godz.)		Dynamika zmian populacji log CFU/cm ³ · h ⁻¹
	0,5 godz.	2 godz.	
Oregano	(-) 0,79	(+) 0,24	0,56
Mięta	0,00	(-) 0,70	0,70
Bazylija	(-) 1,14	0,00	1,14
Rozmaryn	(-) 1,10	(+) 0,18	0,92
Pomidor	(-) 0,30	(-) 0,92	1,22
Cebula	(-) 0,56	(+) 0,12	0,44
Cytryna	(-) 0,92	(-) 0,93	1,85
Pomarańcz	(-) 0,70	(-) 0,30	1,00
Grejfrut	(-) 0,52	(+) 0,12	0,20

(+) wzrost, (-) redukcja liczby.

na efekt hamowania (tab. I). Półgodzinna obecność 10% soków owocowych z hodowlą gronkowca powodowała obniżenie liczby o 0,7–0,92 cfu/cm³ (tab. I). Niskie działanie biostatyczne w stosunku do gronkowców zostało odnotowane dla soku grejfrutowego. Inhibicja populacji gronkowca następowała zaledwie z prędkością 0,2 log cfu/cm³ · h⁻¹. Obserwowana dynamika redukcji gronkowców była niższa niż w przypadku pozostałych badanych owoców, a także ziół i warzyw.

Spośród badanych roślin bazylia, pomidor i cytryna wykazywały najwyższy stopień inhibicji po 2 godz. inkubacji mieszaniny bakterii z 10% homogenatami lub roztworami soków.

Najniższa dynamika zmian wielkości populacji obserwowana była dla interakcji między bakteriami a grejpfrutem, oregano i cebulą.

Dotychczas prowadzone liczne badania nad biostatyczną aktywnością roślin wykazały ich zróżnicowane oddziaływanie na gronkowce. *Preuss* i współpr. badali wpływ różnych antybiotyków, olejów pochodzenia roślinnego na gronkowce (5). Badania te wykazały, że olej z oliwek, olej kozieradkowy, mirtowy oraz wyciąg uzyskiwany z dyni nie wywierały żadnego wpływu na ten rodzaj bakterii niezależnie od stosowanego stężenia. Ziele angielskie, szaflwia, lawenda i liść przesła wykazywały natomiast bakteriobójcze działanie jedynie przy wysokich stężeniach substancji pochodzących z tych roślin.

W wyniku tych badań stwierdzono również, że kminek wykazywał znaczący efekt hamujący zaraz po zmieszaniu z nim kultury gronkowca podczas gdy cynamon, cynamon chiński i olej lebiodkowy były efektywne jedynie przy wyższych stężeniach. Olej lebiodkowy okazał się najbardziej skuteczny dopiero przy stężeniu 63% (v/v).

Sharon i współpr. obserwowali aktywność bakteriostatyczną niektórych substancji izolowanych z roślin krzyżowych, takich jak allil izocyjanianu w stosunku do wielu bakterii patogennych w tym również *Staphylococcus aureus* (6).

Anesini i *Matos* wskazywali na rośliny południowo-amerykańskie jako bogate źródło antygronkowcowych substancji biostatycznych, a *Cruz* zaobserwował biostatyczną skuteczność działania u roślin z gatunku *Mikania triangulans* (7,8,9).

W prowadzonych przez nas badaniach dotyczących biostatycznych właściwości różnych ziół, owoców i warzyw stwierdzono zróżnicowaną podatność gronkowców na działanie fitoncydów zawartych w określonych rodzajach roślin. Wynikało to przede wszystkim ze zróżnicowanego składu roślin. Obecność fitoncydów o zróżnicowanej budowie chemicznej była powodem różnego stopnia i dynamiki zmniejszania liczby bakterii.

Testowany w tych doświadczeniach roztwór bazylii zawierał związek aromatyczny o nazwie metylo p-allilofenol, którego stężenie skutecznie wywoływało zmiany wielkości populacji gronkowców aż o 1,14 log cfu/cm³ w ciągu 2 godz. inkubacji.

Biostatyczne właściwości 2-metylo-5-izopropylofenolu, zawartego w oregano były wielokrotnie badane i dane literaturowe świadczą o istotnym znaczeniu biostatycznym w tej substancji zarówno w stosunku do bakterii, jak i grzybów (10, 11). Badania *Knowles* i współpr. wykazały, że związek ten inhibuje takie drobnoustroje jak *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* (11). Jego inhibicyjną aktywność odnotowuje się również w stosunku do *Saccharomyces cerevisiae* (12). Wśród składników oregano występuje również tymol. W układzie badań modelowych nie obserwowano wysokiego stopnia inhibicji testowanych bakterii przez oregano. Z badań prowadzonych przez innych autorów (13) wynika, że tymol nie działa tak skutecznie na gronkowce jak, np. mentol czy karwakrol. Istnieje prawdopodobieństwo, że jednoczesna obecność tymolu i 2-metylo-5-izopropylofenolu nie dawała takiego efektu hamującego jak w sytuacji kiedy te związki występują w roślinach oddzielnie.

W skład mięty wchodzi takie związki jak mentol, mentan 3-on oraz menton furan. Hamowanie rozwoju gronkowca pod wpływem roztworu mięty było jednak

obserwowane dopiero po 2 godz. inkubacji, co może świadczyć o słabej wrażliwości gronkowców na te związki.

Z badań *Hammera* i współpr. (14) wynika, że w warunkach modelowych olejki eteryczne mięty konieczne do zahamowania rozwoju gronkowców to 1% v/v, a w przypadku bazylii aż 2% v/v, podczas gdy obecność tych substancji zawartych w oregano działała skutecznie już w stężeniu na poziomie 0,12%.

W badaniach dotyczących biostatycznego oddziaływania cebuli nie stwierdzono wysokiej dynamiki zmian testowanej populacji bakterii. Hamowanie wzrostu gronkowców pozostawało na podobnym poziomie po 0,5 i 2 godz. inkubacji bakterii z roztworem cebuli. Nie jest to zgodne z obserwacjami dotyczącymi np. zmacerowanego czosnku.

Z danych literaturowych wynika, że w warunkach modelowych daje się zauważyć wysoki stopień biostatycznego oddziaływania allilu (15).

Substancje zawarte w warzywach takich, jak pomidor to m.in. kwas kofeinowy, występujący w surowcu w znacznych ilościach.

Istnieją nieliczne doniesienia na temat oddziaływania kofeiny na drobnoustroje, a dostępne dane dotyczą biostatycznego oddziaływania kofeiny w stosunku do pałeczek kałowych. Niektórzy badacze stwierdzili w warunkach modelowych skuteczne hamowanie *Escherichia coli O157:H7* przez kofeinę w stęż. 0,5% i wyższych (1). Brak jest danych na temat biostatycznego oddziaływania kwasu kofeinowego na inne bakterie.

Na podstawie danych dostępnych w literaturze można stwierdzić, że warzywa takie jak np. ogórek w warunkach modelowych podtrzymują wzrost gronkowców (2).

Wśród badanych owoców cytrusowych najwyższą aktywność biostatyczną wykazał roztwór z cytryny. Z danych prezentowanych przez *Hammera* i współpr. (14) wynika, że do zahamowania *Staphylococcus aureus* minimalne stężenie inhibicyjne MIC dla olejków eterycznych pochodzących z cytryny i pomarańczy wynosi 2% v/v, a dla grejpfruta jest to stężenie powyżej 2% v/v. Zawartością kwasów w miąższu cytrusów należy więc tłumaczyć zróżnicowane oddziaływanie badanych owoców. Z danych wynika, że kwas cytrynowy zawarty w soku ze świeżych cytryn występuje tam w stężeniu 51,87–60,32 g/dm³, podczas gdy w pomarańczy od 11,1 do 15,65 g/dm³, a w grejpfrucie od 16,96 do 24,25 g/dm³ (3).

WNIOSKI

1. Najwyższą dynamikę w inhibicji gronkowców wykazuje cytryna i bazylija.
2. Stwierdzono niską wrażliwość gronkowców na działanie mięty i soku grejpfrutowego.
3. W przypadku nieznacznej wielkości populacji gronkowców w produktach obecność badanych roślin może przyczyniać się do poprawy bezpieczeństwa wytwarzanych potraw.

I. Steinka, A. Kukułowicz

THE BIOSTATIC INFLUENCE OF PLANT PULP
AND SOLUTIONS ON STAPHYLOCOCCI

Summary

In order to assure safety of food products, plant additives should be of high micro-biological purity, and the phytoncides in those additives should show biostatic activity. Many literature data confirm a significant bacteriostatic effect of herbs, citrus fruit and vegetables commonly applied in gastronomy. The aim of this paper was to assess the influence of citrus fruit, such vegetables as tomato, onion and garlic, as well as seasoning herbs, including oregano, rosemary, mint and basil, on staphylococci survival rate. The 10% juice obtained from each of these plants was added to broth culture of *Staphylococcus aureus* ATC 25923. The highest level of changes in staphylococci population was observed for lemon and basil. The sensitivity of staphylococci to mint and grapefruit juice was low.

PIŚMIENNICTWO

1. Ibrahim S.A., Salameh M.M., Phetsomphou S., Yang H., Seo C.W.: Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. Food Chem., 2006; 99(4): 645-650. – 2. Viswanathan P., Kaur R.: Prevalence and growth of pathogens on salad vegetable, fruits and sprouts. Int. J. Food Microbiol., 2001; 203(3): 205-213. – 3. Karadeniz F.: Main organic acid distribution of authentic citrus juices in turkey. Turk. J., Agric. For, 2004; 28: 267-271. – 4. PN-EN ISO 6888-1, Mikrobiologia żywności i pasz – horyzontalna metoda oznaczania liczby gronowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). – 5. Preuss H.G., Echard b., Dadgar., Talpur N., Monohar V., Enig M., Bagchi D., Ingram C.: Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: in vitro and in vivo. Toxicology Mechanisms and Methods, 2005; 15(4): 279-285. – 6. Shoran B.G., Purrington S.T., Breidt F., Fleming H.P.: Antimicrobial properties of sinigrin and its hydrolysis products. J. Food Sci., 1998; 63(4): 621-624. – 7. Anesini E., Perez C.: Scrining of plants used in argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol., 1993; 39: 119-128. – 8. Matos F.J.A., Aguiar L.M.B.A., Silva M.G.A.: Chemical constitutes and antimicrobial activity of Vatairea macrocarpa Ducke. Acta Amazonica, 1988; 18: 351-352. – 9. Cruz F.G., Roque N.F., Gisbrecht A.M., Davino S.C.: Antibiotic activity of diterpens from *Mikania triangularis*. Fitoterapia 1996; 67: 189-190. – 10. Ultee A., Kets E.P., Smid W.: Mechanisms of action of carvacrol on food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol., 1999; 65(10): 4606-4610.

11. Knowles J., Roller S., Murray D.B., Naidu A.S.: Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Appl. Environ. Microbiol., 2005; 71(2): 797-803. – 12. Knowles J., Roller S.: Efficacy of chitosan, carvacrol, and hydrogen peroxidased biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. J. Food Prot., 2001; 64(10): 1542-1548. – 13. Griffin S.G., S., Wyleli S.G., Markham J.L., Leach D. N.: The role of structure and molecular properties of terpenoides in determining their antimicrobial activity. Flavour and Frag. J., 1999; 14(5): 322-332. – 14. Hammer K.A., Garson C.F., Rile T.V.: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol., 1999; 86: 985-990. – 15. Yoshida H., Katsuzaki H., Ohta R., Ishikawa K., Fukuda H, Fujino T., Suzuki A.: An organosulfur compound isolated from oil-macerated garlic extract, and its antimicrobial effect. Bioscience, Biotechnol. Biochem., 1999; 63(3): 588-590.

Adres: 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7.