

Antimikrobiální účinek esenciálních olejů *in vitro* za různých inkubačních podmínek



Antimicrobial activity of essential oils *in vitro* under different incubation conditions

Mgr. Eliška Jirsová, Mgr. Radka Hulánková, Ph.D.

Veterinární univerzita Brno

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie
hulankovar@vfu.cz



Abstract

The aim of this work was the *in vitro* determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) by the microdilution method, using essential oils from oregano (*Origanum vulgare*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) against important foodborne pathogens (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) under different incubation conditions. There was no statistically significant difference between aerobic and anaerobic cultivation (mean MIC 0.046% for both, $P = 0.743$) no matter the levels of other factors. Likewise, no difference was noted between the incubation temperature of 20 and 30 °C. At 10 °C, the MIC could be determined only for *L. monocytogenes* and *Y. enterocolitica*. Statistically significantly lower MIC values were found at this temperature (0.021 - 0.029%, $P = 0.001$) than at higher temperatures (0.043 - 0.059%). Testing antimicrobial effects in an environment better simulating food storage conditions can enable better estimation of the effectiveness of essential oils in practice.

Materiál a metodika

- minimální inhibiční koncentrace (MIC) – mikrodiluční metoda (Hulánková, 2022)
- 6 druhů patogenních bakterií – viz abstrakt
- sbírkový kmen (ATCC 13932, ATCC 9610, ATCC 13076, ATCC 700728, ATCC 25923, ATCC 14579) a směs pěti izolátů z potravin
- EO - oreganový (*Origanum vulgare*; karvakrol 74 %) a skořicový (*Cinnamomum zeylanicum*; trans-cinnamaldehyd 64 %, eugenol 18 %).
- inkubace při teplotě 30, 20 nebo 10 °C do doby, než došlo k viditelnému růstu v pozitivní kontrole bez EO
- aerobní a anaerobní podmínky (vyvíječ AnaeroGen, Oxoid, UK)
- statistická analýza - smíšený lineární model v programu R

Tabulka č. 1:

Průměrné hodnoty MIC v % u jednotlivých kombinací patogenů, EO a teplot

Druh	EO	10 °C	20 °C	30 °C
Listeria monocytogenes	Skořice	0,021 ± 0,003^a	0,058 ± 0,006^b	0,059 ± 0,007^b
	Oregano	0,045 ± 0,005	0,056 ± 0,005	0,054 ± 0,007
Yersinia enterocolitica	Skořice	0,025 ± 0,005^a	0,043 ± 0,010^{ab}	0,050 ± 0,010^b
	Oregano	0,029 ± 0,003^a	0,043 ± 0,006^b	0,048 ± 0,006^b
Bacillus cereus	Skořice	–	0,034 ± 0,007	0,036 ± 0,007
	Oregano	–	0,041 ± 0,007	0,044 ± 0,005
Escherichia coli O157	Skořice	–	0,058 ± 0,014	0,054 ± 0,010
	Oregano	–	0,048 ± 0,006	0,052 ± 0,006
Staphylococcus aureus	Skořice	–	0,041 ± 0,007	0,042 ± 0,008
	Oregano	–	0,048 ± 0,004	0,052 ± 0,004
Salmonella Enteritidis	Skořice	–	0,064 ± 0,008	0,058 ± 0,007
	Oregano	–	0,044 ± 0,007	0,048 ± 0,008

^{a-b} statisticky významný rozdíl mezi teplotami ($P < 0,05$)

Úvod

Esenciální oleje (EO) jsou vyráběny z různých částí i druhů rostlin. V současné době jsou stále více vyhledávané i v potravinářském průmyslu jako zelená alternativa chemických konzervantů a antioxidantů (Van de Vel et al., 2017). V posledních dekádách byly antimikrobiální vlastnosti celé řady EO zkoumány jak *in vitro*, tak v široké škále potravin. Bohužel se ukázalo, že pro výraznou inhibici mikroorganismů v potravinách jsou reálně potřeba vyšší koncentrace EO než při pokusech *in vitro*. Vyšší koncentrace však mohou negativně ovlivňovat sensorický profil potraviny. Bylo navrženo několik důvodů tohoto rozdílného působení, zejména chemické složení potravin (Gutierrez et al., 2009; Hulánková a Bořilová, 2020). Rozdíly mezi testováním v laboratorních médiích a v potravinách však mohou být ovlivněny i dalšími faktory.

Cílem práce proto bylo ověřit, nakolik je antimikrobiální účinek EO ovlivněn aerobními a anaerobními podmínkami kultivace a kultivační teplotou.

Výsledky a diskuze

Hodnoty MIC se u aerobního a anaerobního prostředí statisticky významně nelišily ($P = 0,743$), a to bez ohledu na kmen/směs kmenů, teplotu či použitý olej. Průměrná naměřená hodnota MIC v aerobním prostředí byla $0,046 \pm 0,012$ %. Anaerobní prostředí mělo stejnou hodnotu MIC $0,046 \pm 0,013$ %. Někteří autoři zjistili vyšší antimikrobiální aktivitu hlavních složek EO v anaerobním prostředí (Juven et al., 1994; Chueca et al., 2014), zatímco ve studii Hammer et al. (1999) také nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi aerobní a anaerobní kultivací.

Dalším sledovaným faktorem byla teplota. Ze získaných výsledků lze říct, že nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi teplotami 20 a 30 °C, nicméně byla pozorována vyšší účinnost EO při teplotě 10 °C (Tab. 1, $P = 0,001$). Při této teplotě však byl zaznamenán růst pouze u psychrotrofních bakterií *L. monocytogenes* a *Y. enterocolitica*. Z hlediska teplot jsou údaje v literatuře spíše opačné než v této práci. Veldhuizen et al. (2007) naopak pozorovali u *L. monocytogenes* vyšší účinnost karvakrolu při teplotě 30 °C než při teplotách 10–20 °C. Obdobně Belda-Galbis et al. (2014) naměřili u *L. monocytogenes* a *E. coli* vyšší MIC karvakrolu při nižších teplotách (8 a 15 °C) než při 30 a 37 °C. Tyto rozdíly byly vysvětlovány nižší metabolickou aktivitou nebo aktivací obranných mechanismů vůči stresu. Rozdíl mezi těmito a našimi výsledky mohl dát tím, že v našem případě byly bakteriální suspenze předem adaptovány na chlad (24 h při 10 °C), což mohlo oslabit odolnost buněk vůči EO. Obdobně ve studii McMahon et al. (2007) teplotní stres zvýšil citlivost patogenních bakterií vůči antibiotikům.

Závěr

Nebyla prokázána statistická významnost mezi inkubací v aerobním a anaerobním prostředí, a to obecně i s ohledem na bakteriální druh a teplotu. Zvýšená inhibice například v potravinách balených v ochranné atmosféře tedy pravděpodobně souvisí pouze s bakteriostatickým účinkem oxidu uhličitého a případnými změnami pH, ne s druhem metabolismu. Naopak teplota může ovlivnit účinnost EO a při jejich aplikaci do potravin je dalším faktorem, který je třeba vzít v potaz při odhadu účinnosti.