

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THYME AND ROSEMARY ESSENTIAL OIL AGAINST ENTEROCOCCI ISOLATED FROM MEAT

Viera Ducková, Margita Čanigová, Miroslav Kročko, Jana Bezeková

ABSTRACT

Traditionally enterococci are considered as part of the lactic acid bacteria. This group of bacteria contaminating mostly food of animal origin and some of them can be resistant to antibiotic. The consumers prefer safe foods free of synthetic additives and therefore interest for natural preservatives is increasing in recent years. The aim of this work was to determine antibacterial activity of essential oil from thyme and rosemary against enterococci. Strains of enterococci were isolated from poultry and pork. The isolates of enterococci were identified as *E. faecalis* and *E. mundtii* and their sensitivity to chosen antibiotic (ampicillin, erythromycin, gentamicin, tetracycline and vancomycin) was determined. Enterococci were experimentally inoculated in nutrient broth at concentration $3 - 4 \log \text{cfu.ml}^{-1}$. The influence of thyme and rosemary essential oil at different concentrations and at different temperatures (6°C and 25°C) against enterococci was tested. As more effective has proved thyme oil, which reliably inhibited both strains at concentration of 0.05 % at 6 and 25°C . Rosemary oil at the highest tested concentrations (of 1 %, respectively 1.5 %) only reduced the number of tested strains of enterococci. The higher antibacterial activity of essential oils was determined at 25°C .

Keywords: enterococci, thyme, rosemary, antibacterial activity

ÚVOD

Enterokoky sa tradične považujú za skupinu baktérií mliečného kysnutia. Sú ubiquitné, pričom ich prirodzeným miestom výskytu je predovšetkým tráviaci trakt človeka a väčšiny zvierat. Z tohto dôvodu sú preto značne zastúpené v surovinách a potravinách živočíšneho pôvodu. Tradične sa považovali za indikátor fekálnej kontaminácie, avšak v posledných rokoch sa pridávajú niektoré kmene do potravín ako súčasť štartovacích kultúr a považujú sa za probiotiká (Franz et al., 1999; Ortigosa et al., 2008). Zdá sa, že majú značný vplyv na tvorbu a zlepšovanie senzorickej kvality potravín. Nie všetky enterokoky sa ale považujú za bezpečné mikroorganizmy (Gelsomino et al., 2001). Dôležitým faktorom pri posudzovaní enterokokov z hľadiska ich bezpečnosti je rezistencia voči antibiotikám, obzvlášť glykopeptidom ako sú vankomycín alebo teikoplanín (Van de Braak et al., 1998; Klein, 2003).

Rozšírené používanie antibiotík v humánnej medicíne, ale i vo veterinárnej praxi sa považuje za jednu z možných príčin nárastu mikroorganizmov s antibiotickou rezistenciou. V snahe obmedziť šírenie a rozvoj rezistencie na antibiotiká sa v Európskej únii zakázalo používanie antimikrobiálnych rastových promotérov (Ouwehand et al., 2010).

V posledných rokoch sa zvyšuje tlak i zo strany konzumentov, ktorí kladú dôraz na bezpečné potraviny, pričom preferujú použitie prírodných alternatív pred pridávaním syntetických aditív do potravín. Značný prísľub v možných aplikáciách v potravinárskom priemysle preto ponúkajú extrakty z rastlín (Over et al., 2009).

Esenciálne oleje (nazývané tiež ako prchavé alebo éterické oleje) sú aromatické olejovité kvapaliny získané z rôznych častí rastlín. Niektoré z nich sú dlho známe

svojimi antibakteriálnymi vlastnosťami. Okrem antibakteriálnych vlastností, esenciálne oleje alebo ich časti môžu mať aj antivirálne, antimykotické, antitoxinogénne, antiparazitické a insekticídne vlastnosti (Burt, 2004).

Hodnotia sa účinky extraktov mnohých rastlín, pričom z doteraz najviac preštudovaných možno spomenúť koriander, škoricu, oregano, rozmarín, šalviu, klinčeky, tymián a pod.

Medzi hlavné zložky esenciálnych olejov, ktoré sú zodpovedné za biologickú aktivitu aromatických i liečivých rastlín, sa radia mono- a sesquiterpény zahrňujúce karbohydráty, fenoly, alkoholy, étery, aldehydy a ketóny (Soković et al., 2010). Ako účinné antibakteriálne látky esenciálnych olejov boli identifikované napr. karvakrol, tymol, eugenol, perillaldehyd, cinnamaldehyd, kyselina škoricová, ktoré majú MIC v rozsahu $0,05 - 5 \mu\text{l.ml}^{-1}$ v podmienkach in vitro. K dosiahnutiu rovnakého efektu v potravinách sú potrebné vyššie koncentrácie. Experimenty s čerstvým mäsom, mäsovými výrobkami, rybami, mliekom, mliečnymi výrobkami, zeleninou, ovocím a varenou ryžou dokázali, že koncentrácia k dosiahnutiu signifikantného antibakteriálneho efektu je v rozmedzí $0,5 - 20 \mu\text{l.ml}^{-1}$ v potravinách (Burt, 2004).

Cieľom práce bolo v modelových pokusoch zhodnotiť antibakteriálnu aktivitu tymiánového a rozmarínového esenciálneho oleja na enterokoky izolované z bravčového resp. kuracieho mäsa.

MATERIÁL A METÓDY

Ako cieľové bakteriálne kmene sa testovali enterokoky z kuracieho a bravčového mäsa. Vo vzorkách mäsa sa enterokoky stanovili na selektívnom diagnostickom médiu

Slanetz-Bartley (Biokar Diagnostic, Francúzsko) po 48 ± 2 hod aeróbnej kultivácie pri teplote 37 ± 1 °C. Suspektné kolónie sa preočkovali na krvný agar a na selektívne médium obsahujúce žižč, eskulín a azid (Biokar Diagnostic, Francúzsko). Po potvrdení izolátov k rodu *Enterococcus* na základe morfológických znakov a biochemických skúšok sa vykonala druhová identifikácia komerčným En-coccus testom (Pliva-Lachema, Česká republika).

U identifikovaných kmeňov sa stanovila citlivosť na antibiotiká - ampicilín 10 µg, erytromycín 15 µg, gentamicín 10 µg, tetracyklín 30 µg a vankomycín 30 µg použitím diskovej difúznej metódy (HiMedia, India) podľa odporúčaní CLSI (CLSI, 2005).

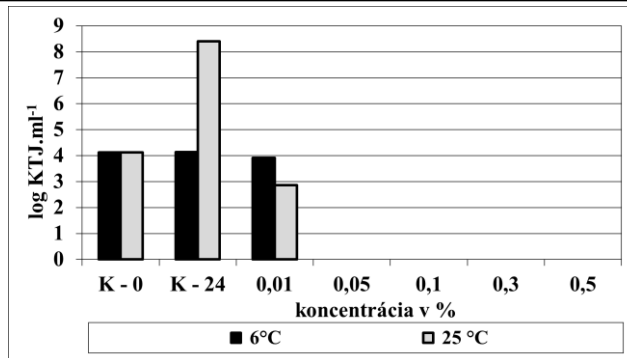
Následne sa hodnotil antibakteriálny účinok esenciálnych olejov z tymiánu a rozmarínu na vybrané kmene. Kmene enterokokov sa naočkovali na GTK agar (HiMedia, India) a kultivovali sa 24 hod pri teplote 37 ± 1 °C. Pre experiment sa pripravila čerstvá bakteriálna suspenzia v Mueller Hinton bujóne s počiatočnou hustotou bakteriálnej kultúry približne 4 až 5 log KTJ.ml⁻¹. Potrebné množstvo tymiánového alebo rozmarínového esenciálneho oleja (Hanus, Slovensko) a 0,5 ml bakteriálnej kultúry sa pridali do uzatvárateľných skúmaviek so 4,5 ml živného bujónu (HiMedia, India). Pozitívna kontrola sa pripravila so živného bujónu a bakteriálnej kultúry avšak bez esenciálneho oleja. Negatívna kontrola obsahovala živný bujón a esenciálny olej, ale bola bez naočkovanvej kultúry enterokokov. Prežívanie enterokokov sa hodnotilo po 24 hod inkubácii pri teplotách 6 a 25 °C. Počty enterokokov sa stanovili na selektívnom diagnostickom médiu Slanetz-Bartley (Biokar Diagnostic, Francúzsko) pri teplote 37 ± 1 °C po 48 ± 2 hod. Uvádzané výsledky sú vypočítané ako priemerné hodnoty z troch opakovaní.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V modelových pokusoch sa pracovalo s kmeňom *Enterococcus faecalis* izolovaným z hydiny a s kmeňom *Enterococcus mundtii* izolovaným z bravčového mäsa. Diskovou difúznou metódou sa u kmeňa *Enterococcus faecalis* zistila rezistencia na erytromycín, gentamicín a tetracyklín, stredná rezistencia na ampicilín a citlivosť na vankomycín. U kmeňa *Enterococcus mundtii* sa dokázala pri tejto metóde rezistencia na ampicilín, stredná rezistencia na gentamicín a tetracyklín a citlivosť na erytromycín a vankomycín.

Kmene enterokokov, izolované z kuracieho a hovädzieho mäsa, rezistentné prinajmenšom na 2 rôzne druhy testovaných antibiotík zistili i Koluman et al. (2009), pričom uvádzajú, že až z 8 % vzoriek kuracieho mäsa izolovali vankomycín-rezistentné kmene enterokokov. Alarmujúce sú výsledky Jung et al. (2007), ktorí zistili vankomycín-rezistentné kmene enterokokov v 77 % vzoriek hydínového mäsa, v 38 % vzoriek hovädzieho mäsa a rovnako v 38 % vzoriek bravčového mäsa.

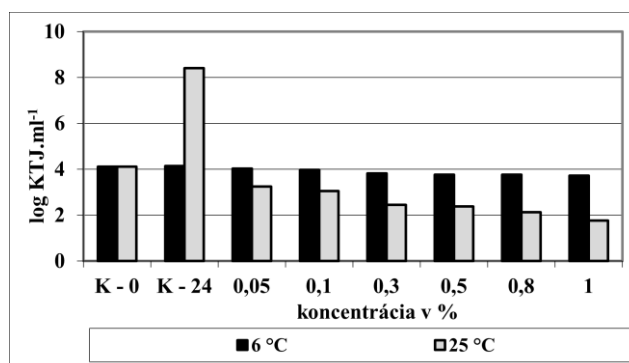
Hlavným cieľom práce bolo otestovať antibakteriálnu aktivitu esenciálnych olejov voči enterokokom. Pre modelové pokusy sa vybrala tymiánová a rozmarínová silica. Z literatúry vyplýva, že účinnými látkami rozmarínu sú α - pinen (2 - 25 %), bornylacetát (0 - 17 %), gáfor (2 - 14 %), 1,8 - cineol (3 - 89 %) a v tymiáne sú to tymol (10 - 64 %), karvakrol (2 - 11 %), γ - terpinen (2 - 31 %) a p - cymen (10 - 56 %) (Burt, 2004).



Obr. 1 Antibakteriálna aktivita tymiánového oleja na *Enterococcus faecalis*

K - 0 - počty enterokokov na začiatku pokusu

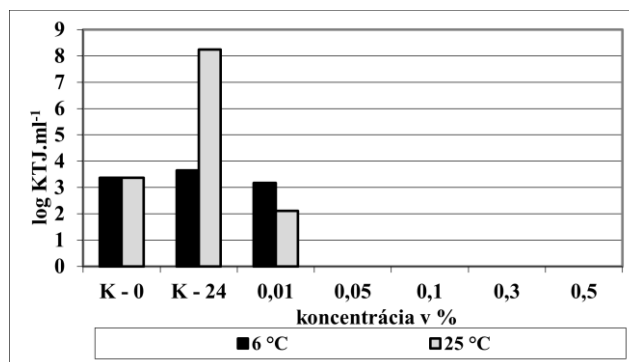
K - 24 - počty enterokokov po 24 hodinách kultivácie



Obr. 2 Antibakteriálna aktivita rozmarínového oleja na *Enterococcus faecalis*

K - 0 - počty enterokokov na začiatku pokusu

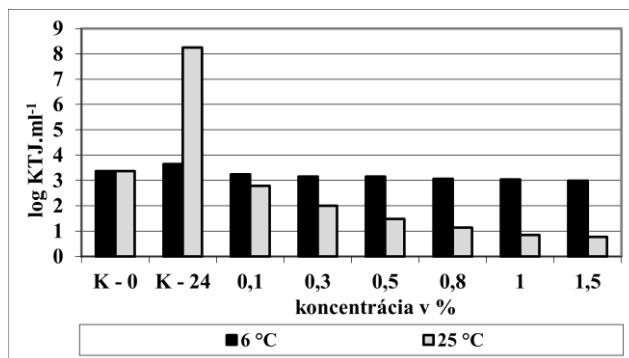
K - 24 - počty enterokokov po 24 hodinách kultivácie



Obr. 3 Antibakteriálna aktivita tymiánového oleja na *Enterococcus mundtii*

K - 0 - počty enterokokov na začiatku pokusu

K - 24 - počty enterokokov po 24 hodinách kultivácie



Obr. 4 Antibakteriálna aktivita rozmarínového oleja na *Enterococcus mundtii*

K - 0 - počty enterokokov na začiatku pokusu

K - 24 - počty enterokokov po 24 hodinách kultivácie

Doteraz nie je štandardný test pre hodnotenie antibakteriálnej aktivity látok voči mikroorganizmom izolovaným z potravín. **Marques et al. (2008)** konštatujú, že väčšina uskutočnených štúdií hodnotí antimikrobiálnu aktivitu esenciálnych olejov v in vitro podmienkach pri teplotách okolo 30 - 37 °C, zatiaľ čo skladovanie potravín sa realizuje bežne aj pri chladiacich teplotách. Rovnako upozorňujú aj na fakt, že vo väčšine štúdií sa uskutočňujú pokusy s vysokou koncentráciou štartovacieho bakteriálneho inokula (väčšinou 6 - 10 log KTJ.ml⁻¹). Z týchto dôvodov sa naše modelové pokusy realizovali pri teplotách 6 °C a 25 °C so štartovacou počiatočnou koncentráciou enterokokov na úrovni 3 - 4 log KTJ.ml⁻¹, v snahe čo najviac sa priblížiť podmienkam v potravinách.

Výsledky antibakteriálnej aktivity tymiánového a rozmarínového esenciálneho oleja na testované kmene enterokokov sú znázornené na obrázkoch 1 až 4.

Ako vyplýva z výsledkov na obr. 1 až 4 esenciálny olej z tymiánu preukázal v porovnaní s rozmarínom vyššiu antibakteriálnu aktivitu voči obojm testovaným kmeňom enterokokov pri oboch teplotách. Tymiánový esenciálny olej pri koncentrácii 0,01 % redukoval počty enterokokov a pri koncentrácii 0,05 % spoľahlivo inhiboval testované enterokoky. V prípade rozmarínového esenciálneho oleja sa tiež zaznamenala redukcia počtu enterokokov, avšak ani 1 % koncentrácia aplikovaná v prípade kmeňa *E. faecalis* a 1,5 % koncentrácia použitá v prípade kmeňa *E. mundtii* neboli dostatočné na úplnú inaktiváciu prítomnej populácie enterokokov. Z výsledkov na obr. 2 a 4 (K - 24) zároveň vyplýva, že rozvoj enterokokov značne obmedzuje aj nízka kultivačná teplota (6 °C). Pri tejto teplote sa zároveň zistil nižší antibakteriálny efekt rozmarínového esenciálneho oleja v porovnaní s teplotou 25 °C, čo mohlo zrejme súvisieť s horším uvoľňovaním účinných látok do prostredia.

Porovnávanie výsledkov s publikovanými údajmi je komplikované, pretože výsledky modelových pokusov sú ovplyvňované množstvom rôznych faktorov a sú testované rôzne skupiny mikroorganizmov. **Selim (2011)** hodnotil antibakteriálnu aktivitu 11 esenciálnych olejov voči 13 kmeňom vankomycín-rezistentných enterokokov. Z výsledkov jeho štúdie vyplýva, že tymiánový olej bol najúčinnjší a MIC 90 a MBC 90 bola 0,25 a 0,5 %. Podľa **Jiang et al. (2011)** MIC rozmarínového oleja kolíše v závislosti od testovaných kmeňov baktérií od 0,03 do 0,1 objemových % a MBC od 0,1 do 0,5 objemových %. Antibakteriálnu aktivitu uvedení autori sledovali pri teplote 37 °C voči kmeňom baktérií r. *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Proteus* a *Pseudomonas*.

Zaouali et al. (2010) porovnávali účinnosť rozmarínového esenciálneho oleja v závislosti od variety rozmarínu. Z ich výsledkov vyplýva, že MIC pre *Enterococcus faecalis* bola na úrovni 10 µl.ml⁻¹ pre extrakt z *Rosmarinus officinalis* var. *typicus* a 5 µl.ml⁻¹ pre *Rosmarinus officinalis* L. var. *trogodytorum*.

Bubonja-Sonje et al. (2011) sledovali antibakteriálnu aktivitu extraktov polyfenolov izolovaných z olivového oleja, kakaa a z rozmarínu voči *Listeria monocytogenes* a *Listeria innocua*. Najsilnejšiu antilisteriálnu aktivitu v rámci testovaných extraktov preukázal extrakt z rozmarínu. MIC komerčného rozmarínového extraktu bola 0,0830 ± 0,023 mg.ml⁻¹ napríklad v porovnaní s MIC extraktu polyfenolov z olivového oleja 0,400 ± 0,096 mg.ml⁻¹.

Okrem pokusov in vitro sa zisťujú antimikrobiálne účinky esenciálnych olejov na mikroorganizmy aj v modelových potravinových systémoch. **Vegera et al. (2011)** sledovali baktericidnú aktivitu hlavných zložiek izolovaných okrem iných aj z rozmarínu a tymiánu voči patogénnym baktériám *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* v mrkvovom nápoji. Kyselina rozmarínová izolovaná z tymiánu a zmesi tymián – šalvia – rozmarín nebola dostatočne účinná na inhibíciu oboch testovaných kmeňov použitých v uvádzanej práci.

Piskernik et al. (2011) testovali antimikrobiálnu účinnosť rozmarínového extraktu aplikovaného do šľavy uvoľnenej z rozmrazených kurčiat a do živného bujónu voči druhu *Campylobacter jejuni*. Zistili, že účinnosť extraktu aplikovaného do šľavy je 4-krát nižšia. Zároveň dokázali, že prežívanie druhu *Campylobacter jejuni* podporuje aj nižšia teplota.

Účinok prírodných antibakteriálnych látok voči typickej kaziacej mikroflóre mäsa v podmienkach in vitro a na bravčovom vákuovo balenom mäse sledovali **Schirmer a Langsrud (2010)**. MIC thymolu, cinnamaldehydu, allylisothiokyanátu, rozmarínového extraktu a extraktu z grapefruitových semienok zisťovali skúškou na mikrotitračných doštičkách. Z ich experimentov vyplýva, že ani 10-násobok MIC zistenej in vitro nebol efektívny na rast mikroorganizmov vo vákuovo balenom bravčovom mäse. Na základe toho konštatujú, že výsledky skúšok na mikrotitračných doštičkách nemôžu byť priamo aplikované v potravinách.

ZÁVER

Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že tymiánový esenciálny olej preukázal lepšiu antibakteriálnu aktivitu voči testovaným kmeňom enterokokov v porovnaní s rozmarínovým olejom. Koncentrácia tymiánového oleja 0,05 % spoľahlivo inaktivovala populáciu testovaných enterokokov.

Rozmarínový olej aj pri koncentráciách 1 % resp. 1,5 % iba redukoval počty enterokokov a nepôsobil na enterokoky letálne. Z výsledkov zároveň vyplýva, že vyššiu antibakteriálnu aktivitu mali esenciálne oleje pri teplote 25 °C než pri teplote 6 °C. Rastlinné esenciálne oleje majú potenciál, aby sa využívali v potravinárstve na inhibíciu patogénnej i kaziacej mikroflóry, je však potrebné, aby sa okrem modelových pokusov in vitro hodnotil aj ich účinok priamo v potravinovej matici.

LITERATÚRA

BUBONJA-SONJE, M., GIACOMETTI, J., ABRAM, M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. In *Food Chemistry*, vol. 127, 2011, p. 1821-1827.

BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, 2004, p. 223-253.

CLSI. 2005. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals*. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005. 86 p.

FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. 1999. *Enterococci at the crossroads of food safety?* In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 47, 1999, p. 1-24.

- GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., CONDON, S., SWINGS, J., COGAN, T. M. 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheese making factory. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 71, 2001, p. 177-188.
- JIANG, Y., WU, N., FU, Y., WANG, W., LUO, M., ZHAO, CH., ZU, Y., LIU, X. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. In *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 32, 2011, p. 63-68.
- JUNG, W. K., LIM, J. Y., KWON, N. H., KIM, J. M., HONG, S. K., KOO, H. CH., KIM, S. H., PARK, J. H. 2007. Vancomycin-resistant *enterococci* from animal sources in Korea. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 113, 2007, p. 102-107.
- KLEIN, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *enterococci* from food and gastro-intestinal tract. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, p. 123-131.
- KOLUMAN, A., AKAN, L. S., ÇAKIROĞLU, F. P. 2009. Occurrence and antimicrobial resistance of *enterococci* in retail foods. In *Food Control*, vol. 20, 2009, p. 281-283.
- MARQUES, A., ENCARNACAO, S., PEDRO, S., NUNES, M. L. 2008. In vitro antibacterial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enteritica*. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, 2008, p. 2357-2360.
- ORTIGOSA, M., IRIGOYEN, A., URDIN, M., GARCÍA, S., IBAÑEZ, F. C., TORRE, P. 2008. Identification of *enterococci* and isolation of vancomycin-resistant strains in Spanish cheeses. In *Milchwissenschaft*, vol. 63, 2008, no. 2, p. 164-167.
- OUWEHAND, A. C., TIIHONEN, K., KETTUNEN, H., PEURANEN, S., SCHULZE, H., RAUTONEN, N. 2010. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. In *Veterinarni Medicina*, vol. 55, 2010, no. 2, p. 71-78.
- OVER, K. F., HETTIARACHCHY, N., JOHNSON, M. G., DAVIS, B. 2009. Effect of Organic Acids and Plant Extracts on *Escherichia coli* O 157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* in Broth Culture Model and Chicken Meat Systems. In *Journal of Food Science*, vol. 74, 2009, no. 9, p. M515-M521.
- PISKERNIK, S., KLANČNIK, A., RIEDEL, CH. T., BRØNDSTED, L., MOŽINA, S. S. 2011. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antibiotics in chicken meat-related conditions. In *Food Control*, vol. 22, 2011, p. 718-724.
- SELIM, S. 2011. Antibacterial activity of essential oil against vancomycin resistant enterococci (VRE) and *Escherichia coli* O157:H7 in Feta cheese and minced beef meat. In *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, 2011, p. 187-196.
- SCHIRMER, B. CH., LANGSRUD, S. 2010. Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria *In Vitro* and in Vacuum-Packed pork Meat. In *Journal of Food Science*, vol. 75, 2010, no. 2, p. M98-M102.
- SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., MARIN, P. D., BRKIĆ, D., VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. 2010. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using *In Vitro* Model. In *Molecules*, vol. 15, 2010, p. 7532-7546.
- VAN DE BRAAK, N., VAN BELKUM, A., VAN KEULEN, M., VLIEGENTHART, J., VERBRUGH, H., ENDTZ, H. P. 1998. Molecular characterization of vancomycin-resistant *enterococci* from hospitalized patients and poultry products in the Netherlands. In *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36, 1998, p. 1927-1932.
- VEGERA, S., FUNES, L., MARTÍ, N., SAURA, D., MICOL, V., VALERO, M. 2011. Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituents of plant extracts in carrot broth. In *Food Chemistry*, vol. 128, 2011, p. 872-877.
- ZAOUALI, Y., BOUZAINÉ, T., BOUSSAID, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, 2010, p. 3144-3152.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA No. 1/0897/11.

Contact address:

Ing. Viera Ducková, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: viera.duckova@uniag.sk

doc. Ing. Margita Čanigová, CSc., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: margita.canigova@uniag.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mirokrocko@yahoo.com

Ing. Jana Bezeková, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: j.bezekova@gmail.com