

Rola handlowych olejków eterycznych i ekstraktów z mięty pieprzowej w kontrolowaniu rozwoju glukuronidazododatniego izolatu *E. coli* 48

Julia Gdowska¹, Sandra Gębczyńska¹, Emilia Małkusz¹, Bartosz Rył¹

opiekun Koła Naukowego Biotechnologów UO: dr hab. inż. Teresa Krzyśko-Łupicka, prof. UO

¹ Uniwersytet Opolski, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Instytut Inżynierii Środowiska i Biotechnologii, 45-032 Opole, ul. Kominka 6a

WSTĘP

Wzrost lekooporności wśród mikroorganizmów, jak i obecnie trendy na stosowanie środków konserwujących naturalnego pochodzenia spowodowały zwiększenie zainteresowania potencjalnymi preparatami biobójczymi takimi jak olejki eteryczne i ekstrakty roślinne.

Olejek z mięty pieprzowej (*Mentha x piperita* L.) jest wykorzystywany w przemyśle ze względu na aktywność biologiczną, właściwości lecznicze oraz walory zapachowe. Otrzymuje się go na drodze destylacji parą wodną, zawartość olejku w surowcu wynosi od 1,0 - 3,5%. [1] Głównymi lotnymi związkami organicznymi występującymi w olejku z mięty pieprzowej są min. mentol, menton, octan metylu oraz mentofuran. Skład chemiczny olejków i ekstraktów miętowych jest silnie zróżnicowany ze względu na pochodzenie. [2, 3].

CEL I ZAKRES PRACY

Celem przeprowadzonych badań było: wyodrębnienie bakterii *E. coli* z aparatury przemysłowej linii produkcyjnej soków jednodniowych, ocena obecności enzymu glukuronidazy, ocena wrażliwości wyizolowanego szczepu na substancje o charakterze antybiotycznym oraz badania wrażliwości tego szczepu na olejki eteryczne i ekstrakty miętowe.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

- Materiał do badań stanowił izolat *E. coli* 48 wyosobniony z linii technologicznej produkcji soków jednodniowych na podłożu ENDO (BTL, Polska).
- Obecność glukuronidazy oceniono w podłożu chromogennym TBX (BTL, Polska) inkubowanym w temperaturze 44°C przez 24 godziny.
- Metodą Kirby-Bauera [4] w podłożu Mueller-Hinton (Biomaxima, Polska) oznaczono oporność *E. coli* 48 na antybiotyki: Ampicylinę (AM 10µg), gentamycynę (CN 10µg), tetracyklinę (TE 30µg), chloramfenikol (C 30µg) i mieszaninę sulfametoksazolu i trimetoprimu (SXT25). Klasyfikacji jako szczep wrażliwy/oporny dokonano na podstawie rekomendacji EUCAST. [5]
- Metodą dyfuzyjną płytkowo-cylinderkową oceniono wrażliwość izolatu na komercyjne olejki eteryczne i ekstrakty z mięty pieprzowej o stężeniach 0,5-4,0 [%]. Roztwory olejków i ekstraktów sporządzono w wodzie z Tween 80 (BTL, Polska). W badaniach wykorzystano handlowe olejki miętowe firmy Aromatika, VeraNord, Semifarm, Dr. Beta i ETJA oraz dwa ekstrakty z mięty pieprzowej uzyskane metodą Soxhleta - ekstrakt z ogrodowej mięty pieprzowej i ekstrakt z mięty z Maroka. Kontrolę względną stanowiła woda z Tween 80, a kontrolę bezwzględną olejek tymiankowy firmy ETJA. Strefy zahamowania wzrostu podano w [mm].
- Analizę GC-MS próbek badanego olejku miętowego wykonano za pomocą chromatografu gazowego HP 689 sprzężonego ze spektrometrem masowym HP 5973A firmy Hewlett – Packard.

WYNIKI

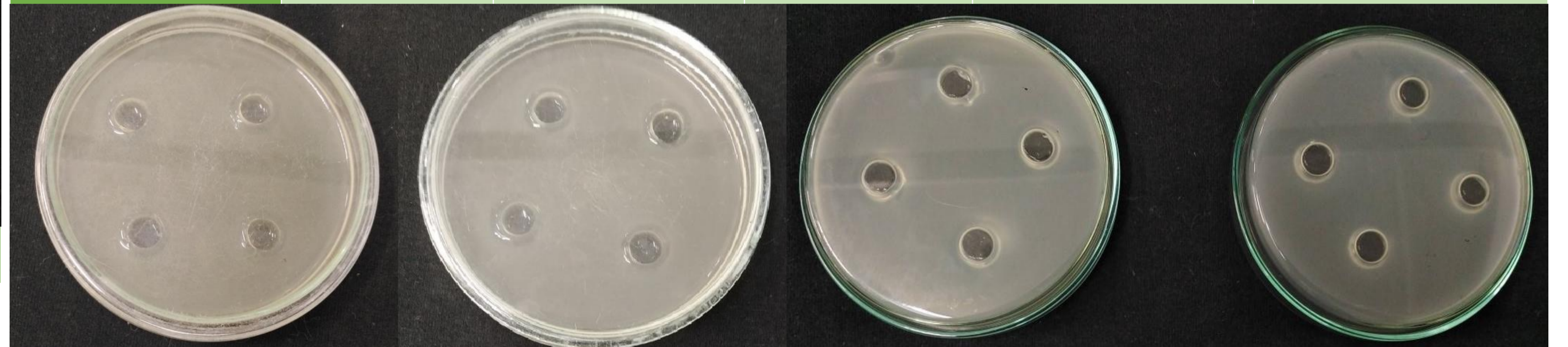
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że izolat *E. coli* 48 był laktozododatni (rys 1B), glukoronidazododatni (rys.1A) i multioporny (Tab. 1). Wykazał on wrażliwość jedynie na olejek miętowy firmy VeraNord o stężeniach 3,0 i 4,0 %, a więc wyższych niż kontrolnie zastosowany olejek tymiankowy, który hamował rozwój tego izolatu od stężenia 1,5%. (Tab. 2., Rys. 2. i 3)



Rys.1. Wzrost izolatu *E. coli* 48 na podłożach A – TBX; B- ENDO; C- agar odżywczy

Tabela 1. Lekooporność izolatu *E. coli* 48 na testowane antybiotyki

antybiotyki	ampicylina (AM 10µg)	gentamycyna (CN 10 µg)	tetracyklina (TE 30 µg)	chloramfenikol (C 30 µg)	sulfametoksazol i trimetoprim (SXT25)
Oporność/ Wrażliwość	R	S	R	R	R
Strefa zahamowania wzrostu [mm]	<14	≥17	<14	<17	0



Rys. 2. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* 48 uzyskane przy zastosowaniu olejku z mięty pieprzowej firmy VeraNord (B), po lewej – stężenie 3,0%, po prawej – stężenie 4,0%

Rys. 3. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* 48 uzyskane przy zastosowaniu olejku tymiankowego firmy ETJA (T), po lewej – stężenie 1,5%, po prawej – stężenie 2%

Tabela 2. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* 48 [mm] ± SD

Typ ekstraktu/ Stężenie [%]	K	A	B	C	D	E	F	G	H	T
0,5	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a
1	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a
1,5	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	12,50±2,12
2	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	16,75±0,65
2,5	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	n/o
3,0	b/a	b/a	13,13±0,75	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	n/o
4,0	b/a	b/a	15,38±0,85	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	n/o

±Odchylenie standardowe (SD), oznaczenia: b/a – brak aktywności; n/o – nie oznaczono aktywności; K- kontrola; A – olejek firmy Aromatika; B – olejek firmy VeraNord, C – olejek firmy Avicenna-Oil, D – olejek firmy Semifarm, E – olejek firmy Dr. Beta, F – olejek firmy ETJA, G – ekstrakt z ogrodowej mięty pieprzowej, H – ekstrakt z mięty z Maroka, T – olejek tymiankowy firmy ETJA

WYNIKI

Na podstawie analizy chromatograficznej wykazano, że głównymi składnikami olejku z mięty pieprzowej VeraNord były mentol (48,50%) i menton (21,70%), a dalej: izomenton (7,58%), octan mentolu (5,20%). Pozostałe składowe występowały w stężeniach poniżej 5%. (Tab. 3.)

Tabela 3. Skład jakościowo-ilościowy olejku z mięty pieprzowej firmy VeraNord

Nazwa związku	Czas retencji [min]	Powierzchnia [%]	IR (indeks retencji)
α -pinen	4,46	0,94	936
β -pinen	5,38	1,51	978
limonen	6,70	4,72	1030
izopulegol	9,82	0,90	1145
menton	10,09	21,70	1150
izomenton	10,31	7,58	1159
neomentol	10,37	3,33	1165
mentol	10,81	48,50	1177
lewomentol	10,89	0,71	1178
α -terpineol	11,12	0,51	1190
pulegon	12,31	1,68	1234
piperyton	12,73	0,51	1254
octan izomentolu	13,30	0,23	1282
octan mentolu	13,81	5,20	1296
β -burbonen	16,01	0,21	1384
kariofilen	16,85	1,78	1410

Wnioski

- Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że laktozo- i glukoronidazododatni oraz multioporny izolat *E. coli* 48 wykazał wrażliwość jedynie na olejek miętowy firmy VeraNord o stężeniach 3,0 i 4,0 %, a więc wyższych niż kontrolnie zastosowany olejek tymiankowy, który hamował rozwój tego izolatu od stężenia 1,5%
- Głównymi składnikami olejku z mięty pieprzowej VeraNord były mentol (48,50%) i menton (21,70%), izomenton (7,58%) i octan mentolu (5,20%), co wskazuje, że potencjalnie możliwa jest implementacja tego olejku w roli „naturalnego konserwantu” poprawiającego przy tym cechy sensoryczne produktu finalnego

Literatura:

- [1] Kasprzykowska R., Kołodziejczyk A.S., Jankowska E., Stachowiak K., *Preparatyka i analiza związków naturalnych*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego 2014, s. 87-88.
- [2] Adaszyńska M., Swarczewicz M., Markowska-Szczupak A., Jadczak D., *Skład chemiczny i właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku eterycznego i ekstraktu z mięty pieprzowej odmiany 'asia'*, ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2013, 2(87), s. 116 – 125.
- [3] Singh P., Pandey A.K., *Prospective of Essential Oils of the Genus Mentha as Biopesticides: A Review*, Frontiers in Plant Science, 9, 2018, 1295.
- [4] Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M., *Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method*, American Journal of Clinical Pathology, 45, 1966, s. 493-496.
- [5] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters*, Version 5.0, 2020.