

## Bakterijų jautrumo antimikrobinėms medžiagoms priklausomybė nuo kultūrų fiziologinės būklės ir kultivavimo temperatūros

A. Šarkinas

KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; Antanas\_Sarkinas@ktu.lt

Ekstraktų antimikrobinės savybės vertintos difuzijos į agarą metodu. Pasirinktos bakterijų *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella agona*, *Escherichia coli* (ATCC 25922) bei mielių *Trichosporon cutaneum* kultūros. Lašelių skaičiaus kitimas skystoje terpėje su ekstraktais laikymo metu stebėtas sėjant ir nustatant jų skaičių (KSV/ml) po 24 ir 48 valandų. Vertinant testavimo kultūrų fiziologinės būklės įtaką jautrumui, su agaru maišyta 18 h kultūra ir keletą parų kambario temperatūroje po užauginimo išlaikyta kultūra ant nuožulnaus agaro. Sporų suspensijai paruošti *B. subtilis* kultūra sėta ant nuožulnaus agaro ir inkubuota 5 paras 37 °C temperatūroje. Nuplauta nuo nuožulnaus agaro *B. subtilis* suspensija pasterizuota, o prieš naudojimą skiesta iki reikiamo drumstumo.

Vertinant augalų ekstraktų antimikrobinės savybės nustatyta, kad gelsvės, rozmarino, raudonėlio, peletrūno, mairūno, salierų, petražolės įvairių frakcijų ekstraktai slopino bakterijų augimą skystoje terpėje ir tiriant difuzijos į agarą metodu. Minėtų medžiagų poveikis jaunoms 18 h kultūroms ir išlaikytoms 5 paras kultūroms skyrėsi, pastarosios mažiau jautrios, tai būdinga ir bakterijų sporoms. Dalis kultūrų buvo jautresnės antimikrobinėms medžiagoms žemesnėje temperatūroje, *Bacillus subtilis* sporos visose temperatūrose sudarė vienodo skersmens skaidrias zonas.

**Raktažodžiai:** augalų ekstraktai, bakterija, antimikrobinės savybės.

### Įvadas

Augalų ekstraktų antimikrobinės savybės nagrinėjamos daugelyje literatūros šaltinių. Nemažai dėmesio skiriama antimikrobinėms savybėms įvertinimo metodikos klausimams. Tyrimuose daugiausiai taikomas difuzijos į agarą metodas su įdubomis. Literatūroje galima aptikti ir įvairių metodikų panaudojimo aprašymų. Difuzijos į agarą metodas gali būti naudojamas ir su popieriniais diskais, kaip tiriant metanolinių ir vandeninių ekstraktų antimikrobinės savybes. *Hovenia dulcis* ekstrakto aktyvioji medžiaga identifikuota, kaip rūgštis, kurios 500 µg/ml slopina testavimo kultūrų *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* augimą [1]. Naudojant popierinius diskus, difuzijos į agarą metodu tiriamos ir eterinių aliejų antimikrobinės savybės. Kaip testavimo kultūros parinktos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*. Eterinių aliejų antimikrobinės savybės pasireiškia naudojant 0,01 % etanolinius tirpalus. Efektyviausias buvo čiobrelis eterinis aliejus, o jautriausia kultūra – *Bacillus amyloliquefaciens*. Pagrindinis eterinių aliejų komponentas ir aktyvioji dalis, įvairiuose augaluose svyruojanti nuo 53,3 iki 86,9 %, yra karvakrolis.

Siūloma naudoti eterinius aliejus kaip natūralius maisto produktų konservantus [2].

Etanolinių ekstraktų antimikrobinis aktyvumas vertinamas triptono sojos sultinyje su 0,12 % ekstrakto po inkubavimo su testavimo kultūromis 12 h 37 °C temperatūroje. Modelinės sistemos su ekstraktu kaitinimas 80 °C temperatūroje susilpnina antimikrobinės savybės, tačiau sterilizavimas 121 °C temperatūroje inhibitorinį efektą padidina [3]. Ištyrus ciberžolės, kietio, rūgčio, gvazdikėlių ekstraktų antimikrobinės savybės nustatytas antimikrobinis poveikis, kuris buvo vertinamas terpę su kultūra ir ekstraktu išlaikius 7 paras. *E. coli* augimą įvairūs bandomieji ekstraktai slopino 36–51 %, *P. aeruginosa* – 55–100 %, *S. cerevisiae* – 33 – 100 % [4], buvo siekiama nustatyti ir minimalią inhibitorinę ekstraktų koncentraciją [5].

Problema gali sudaryti užterštumas sporomis. Parenkant metodiką sporų inaktivavimo tyrimui jų suspensija pirmiausiai kaitinama 70 °C temperatūroje 15 min, toliau laikoma įvairios temperatūros terpėje su antimikrobinėmis medžiagomis, periodiškai kas 3 h nustatant likusių gyvų sporų skaičių, pasėlius auginant 24 h 30 °C

temperatūroje. Jaunos sporos žūva greičiau, lyginant su senesnėmis [6].

Darbo tikslas yra įvertinti bakterijų kultūrų fiziologinės būklės ir kultivavimo temperatūros įtaką antimikrobinių medžiagų efektyvumui.

### Tyrimo metodai

Augalų ekstraktų ir eterinių aliejų antibakteriniam aktyvumui įvertinti naudotos maisto produktuose nepageidautinų bakterijų, tarp jų ir patogeninių, kultūros. Ekstraktų antimikrobinės savybės vertintos difuzijos į agarą metodu. Pasirinktos gramteigiamos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* ir gramneigiamos testavimo kultūros *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella agona*, *Escherichia coli* (ATCC 25922, bei mielės *Trichosporon cutaneum*, išskirtos nuo įrangos pieno perdirdavimo įmonėse.

Antibakterinis aktyvumas įvertintas difuzijos į agarą metodu. Bakterijų ląstelių suspensijai paruošti bakterijų kultūros 18 h buvo auginamos 37 °C terpėje ant nuožulnaus agaro. Nuplauta bakterijų suspensija buvo skiedžiama pagal Mc Farlando standartą Nr. 0,5, gerai sumaišoma purtykle, ir 1 ml suspensijos supilamas į 100 ml ištirpintos ir atvėsintos iki 47 °C temperatūros standžios terpės bendram bakterijų skaičiui nustatyti, dar kartą gerai permaišoma, kad ląstelės tolygiai pasiskirstytų. Tokiu būdu paruoštas bakterijų ląstelių suspensijos mišinys su terpe skubiai išpilstomas po 10 ml į 90 mm skersmens stiklines Petri lėkšteles. Terpei sustingus, joje padaromos 6 įdubos (8 mm skersmens), į kurias pilama po 50 µl 50, 10 ir 1 % ekstraktų etanolinių tirpalų.

Antimikrobinis poveikis bakterijų kultūroms buvo vertinamas po 24 h, o mielių kultūroms – po 24–48 h kultivavimo pagal skaidrių zonų, susidariusių aplink įdubas, skersmenį milimetrais. Jei aplink įdubas skaidrios zonos nesusidaro, daroma išvada, kad tirta medžiaga ar koncentracija neturi baktericidinio poveikio tiriamai kultūrai.

Nustatant ekstraktų poveikį skystoje terpėje, į 10 ml smegenų ir širdies sultinio įpilama 0,5 ml atitinkamo ekstrakto etanolinio tirpalo ir 0,01 ml 18 h testavimo kultūros, užaugintos ant nuožulnaus agaro, suspensijos, praskiestos pagal Mc Farlando standartą Nr. 0,5. Paruošti mėginiai laikomi kambario temperatūroje ar termostate. Ląstelių skaičiaus dinamika stebima sėjant ir nustatant jų skaičių (KSV\*/ml) po 24 ir 48 valandų.

Minimaliai baktericidinei koncentracijai nustatyti į 10 ml smegenų ir širdies sultinio įpilama

0,01 ml 18 h testavimo kultūros suspensijos, užaugintos ant nuožulnaus agaro, praskiestos pagal Mc Farlando standartą Nr. 0,5, ir įvairus atitinkamo ekstrakto etanolinio 10 % tirpalo kiekis. Paruošti mėginiai laikomi 15–20 °C temperatūroje. Antimikrobinis efektas vertinamas lyginant bakterijų skaičių tiriamuose mėginiuose, terpėje be priedų ir terpėje su 0,5 ml etanolio, ląstelių skaičių nustatant po 24 ir 48 h. Nenustačius baktericidinio efekto ir užaugus tam tikram ląstelių skaičiui, apskaičiuojamas inhibicijos efektyvumas, t.y. kiek procentų mažiau gyvų ląstelių rasta tiriamajame mėginyje, lyginant su terpe be ekstraktų priedų.

Vertinant testavimo kultūrų fiziologinės būklės įtaką jautrumui, su agaru buvo maišoma 18 h kultūra ir keletą parų kambario temperatūroje po užauginimo išlaikyta kultūra ant nuožulnaus agaro.

Sporų suspensijai paruošti *B. subtilis* kultūra sėjama ant nuožulnaus agaro ir inkubuojama 5 paras 37 °C temperatūroje. Nuplauta nuo nuožulnaus agaro *B. subtilis* suspensija mėgintuvėlyje pasterizuojama 10 min 80 °C temperatūroje, prieš naudojant skiedžiama iki reikiamo drumstumo.

### Rezultatai ir jų aptarimas

Augalų ekstraktai turi antimikrobinių savybių. Savo tyrimuose siekėme nustatyti poveikio skirtumus priklausomai nuo ląstelių fiziologinės būklės bei įvertinti, ar ekstraktai turi baktericidinį ar baktericidinį efektą. Kaip testavimo kultūra pasirinkta *Bacillus subtilis*, lygiagrečiai vertinant augalų ekstraktų ir antocianinų poveikį sporoms ir 18 h kultūrai, išlaikant mėginius iki 7 parų. 1 lentelėje pateikti rezultatai rodo, kad parinkti augalų ekstraktai slopino testavimo kultūros augimą ir sudarė skaidrias zonas. Stipriausiai veikė rozmarino ekstraktas, kur susidarė 24 mm slopinimo zonos lėkštelėse su 18 h kultūra. 5 % tirpalas irgi sudarė platesnę kaip 20 mm slopinimo zoną, nors tiesioginės priklausomybės tarp zonų skersmens ir tirpalo koncentracijos nerasta, 5 ir 10 % ekstraktų tirpalai lėmė skirtingo skersmens zonų susidarymą, nors jos ir nesiskyrė dvigubai. Jautrios rozmarinui buvo ir *B. subtilis* sporos, tačiau slopinimo zonos susidarė 8–10 % mažesnės, taigi rozmarino poveikis sporoms buvo šiek tiek silpnesnis. Gelsvės ekstraktas taip pat efektyviai slopino testavimo kultūros augimą, tačiau jos poveikis sporoms ir 18 h kultūrai nesiskyrė.

Petražolės šaknų ekstraktui būdingas antimikrobinis poveikis, tačiau jaunos kultūros ir sporų jautrumas beveik nesiskiria. Taigi tik rozmarino ekstraktas skirtingai veikia sporas ir jauną kultūrą.

Vertinant ekstrakto poveikio trukmę zonos buvo išmatuotos po 24 h, lėkštelės išlaikytos kambario

\* KSV – kolonijas sudarantys vienetai

temperatūroje 6 paras ir vėl padėtos į 37 °C termostatą dar vienai parai. Po pakartotinio inkubavimo slopinimo zonos išliko, taigi ekstraktų poveikis yra baktericidinis, nes testavimo kultūros augimas neprasidėjo ir po 7 parų išlaikymo. Pakartotinai išmatuoti zonų dydžiai daugeliu atveju išliko tokie pat, o gelsvės ekstraktas po 7 parų stipriau slopino 18 h kultūrą, nes slopinimo zonos padidėjo.

Taigi, galima konstatuoti, kad augalų ekstraktų antimikrobinis poveikis yra baktericidinis, pasireiškiantis tiek sporų, tiek jaunų kultūrų atžvilgiu, nors poveikis sporoms daugeliu atveju yra

silpnesnis. Galima spėti, kad sporų būsenoje *Bacillus subtilis* yra atspari tiriamoms medžiagoms, o jos veikia sporų dygimo metu, kuris prasideda šiek tiek vėliau, nei difunduoja ekstraktas.

Palygintas jaunų 18 h kultūrų ir 5 paras išlaikytų kultūrų jautrumas antimikrobinėms medžiagoms. Testavimo kultūrai *S. typhimurium* nežymiai stipresnis antocianinų poveikis nustatytas jauni kultūrai – skaidrių zonų vidurkis didesnis 1,5 mm, o lyginant su kitomis testavimo kultūromis, jauna *S. typhimurium* kultūra sudarė didžiausias slopinimo zonas – vidurkis 17,41 mm.

**1 lentelė.** *Bacillus subtilis* fiziologinės būklės įtaka kultūros jautrumui augalų ekstraktams

Eil. Nr.	Tiriamoji medžiaga		Slopinimo zonų plotis, mm			
	ekstraktų žaliava	koncentracija, proc.	sporos		18 h kultūra	
			po 18 h	po 7 parų	po 18 h	po 7 parų
1	Rozmarino	10	21,66±0,47	nepakito	24,00±0,00	nepakito
2		5	19,66±0,94	nepakito	21,33±1,24	nepakito
3	Petražolės	10	16,00±0,00	nepakito	15,33±0,47	nepakito
4		5	14,33±1,24	nepakito	13,33±0,47	nepakito
5	Gelsvės	10	18,33±1,88	nepakito	18,33±0,47	20,66±0,47
6		5	15,66±0,94	nepakito	16,00±0,00	20,00±0,81

**2 lentelė.** *Salmonella typhimurium* fiziologinės būklės įtaka kultūros jautrumui antocianinams

Antocianinai		Slopinimo zonos plotis, esant skirtingai kultūros augimo fazei, mm	
Augalo pavadinimas	Koncentracija, proc.	18 h	5 dienų
1. Mėlynių uogos	2,18	18,33±0,94	17,66±0,94
2. Spanguolių uogos	0,1	16,33±0,47	17,66±1,88
3. Juodieji serbentai <i>Ben Alder</i> , uogos	0,9	20,00±1,63	14,66±0,47
4. Juodieji serbentai <i>Vakariai</i> , uogos	0,77	18,33±0,47	13,00±0,00
5. Mėlynių uogų išspaudos	2,69	13,00±0,00	0,00±0,00
6. Spanguolių uogų išspaudos	0,15	16,00±0,81	13,00±0,00
7. Juodieji serbentai <i>Ben Alder</i> , išspaudos	1,57	17,66±0,47	15,00±0,00
8. Juodieji serbentai <i>Vakariai</i> , išspaudos	0,98	18,00±0,00	17,33±0,24
9. Mėlynių uogos	4,29	18,33±1,24	18,00±0,00
10. Spanguolių uogos	0,4	21,33±2,35	19,00±0,00
11. Juodieji serbentai <i>Ben Alder</i> , uogos	2,85	18,00±0,00	18,00±0,81
12. Juodieji serbentai <i>Vakariai</i> , uogos	2,37	13,66±1,24	19,66±0,94

Vertinant antimikrobinės savybės taikytos ir kitos metodikos. Tiriamų antimikrobinų medžiagų poveikis kitai *Salmonella* genčiai priklausančiai kultūrai *Salmonella agona* buvo įvertintas skystoje

terpėje. Smegenų ir širdies sultinyje su 5400 KSV/ml testavimo kultūros buvo vertinamas ekstraktų ir antocianinų poveikis, lyginant su kontroliniu variantu – terpe be priedų. Siekiant nustatyti

temperatūros poveikį tiriamų medžiagų antimikrobinėms savybėms, lygiagrečiai vertinti nepasterizuoti ir pasterizuoti 80 °C temperatūroje 10 min mėginiai. Pateikti 3 lentelėje duomenys rodo, kad visos tirtos medžiagos slopina testavimo kultūros augimą po 24 h, lyginant su kontrole, kurioje ląstelių skaičius išaugo apie 300 kartų, kai tarp tiriamųjų mėginių padidėjimas užfiksuotas tik variantuose su mėlynių antocianiniais 1,6–2,6 karto, terpėje su 0,01 % pasterizuoto rozmarino ekstraktų ląstelių skaičius liko stabilus, kituose mėginiuose jis sumažėjo, tačiau nei vienos koncentracijos medžiagos tirpalo poveikis po 24 h nebuvo baktericidinis, toks efektas pastebimas tik po 48 h. Tokį poveikį turi 0,5 ir 0,1 % rozmarino ekstrakto tirpalai, pasterizacija susilpnino antimikrobinės savybės, bandiniuose su pasterizuotu ekstraktu baktericidinis efektas nenustatytas.

Antocianinų poveikis išlieka ir po 48 h, ląstelių skaičius auga lėčiau nei kontrolinio varianto, bet lyginant su pradiniu skaičiumi išauga 8,5–15,0 kartų (kontrolinis variantas - apie 4300 kartų).

Tiriant ekstraktų poveikį *Enterococcus faecalis* kultūrai į terpę buvo įpilta 40000 KSV/ml ląstelių (4 lentelė). Atrinktų ekstraktų poveikis buvo

silpnėjęs, baktericidinį efektą turėjo tik 0,1 % rozmarino ekstraktas, 0,01 ir 0,05 % kultūros augimą tik sulėtino – ląstelių skaičius išaugo 1,75–2,50 karto. Terpėje su juodųjų serbentų antocianiniais ir gelsvės ekstraktu ląstelių skaičius lyginant su pradiniu išaugo šimtus kartų, tačiau kontroliniame variante jis padidėjo daugiausiai, 750 kartų, *E. faecalis* atsparus ir pieno bandinių konservantui „NEBA“, terpėje su šia medžiaga ląstelių skaičius padidėjo 400 kartų.

Taigi tarp tirtų medžiagų baktericidinį efektą turėjo tik tirta rozmarino ekstrakto koncentracija, o pasterizacija susilpnino jų antimikrobinio poveikio stiprumą.

Testavimo kultūros nevienodai jautrios vandens aktyvumo pokyčiams. Šį rodiklį terpėje pabandėme sumažinti valgomosios druskos priedais. Mairūno ekstraktų frakcijų etanolinių tirpalų antimikrobinės savybės skirtingos. Efektyviausia buvo mairūno acetoninė frakcija, mažiau aktyvi metanolinė, o vandeninė frakcija *E. coli* ir *Trichosporon cutaneum* augimo neslopino. Mairūno eterinis aliejus stipriai veikė abi kultūras, jų augimas buvo nuslopintas visoje lėkštelėje (5 lentelė).

### 3 lentelė. *Salmonella agona* ląstelių skaičiaus pokyčiai skystoje terpėje su natūraliomis antimikrobinėmis medžiagomis

Terpė ir priedai	Po 24 h			Po 48 h		
	tūkst. KSV/ml	padidėjimas lyginant su kontroliniu variantu, proc.	padidėjimas lyginant su pradiniu skaičiumi, kart.	tūkst. KSV/ml	padidėjimas lyginant su kontroliniu variantu	
					proc.	kartai
1. Bandinys be priedų	1600±130	-	296	23000±1600	-	4259
2. Rozmarino ekstraktas, 0,5 %	0,02±2,6	0,0125	0,04	0	0	-
3. Rozmarino ekstraktas, 0,5 % pasterizuotas	1,2±1,1	0,075	0,22	0,06±0,006	0,00003	0,11
4. Rozmarino ekstraktas, 0,1 %	4,8±1,6	0,3	0,88	0	0	-
5. Rozmarino ekstraktas, 0,1 %, pasterizuotas	5,4±1,9	0,33	1	3,4±2,6	0,00014	0,62
6. Mėlynių uogų antocianinų, 5 %	14±1,2	0,88	2,59	96±17	0,04	17
7. Mėlynių uogų antocianinų, 5 % pasterizuotas	8,8±3,6	0,55	1,62	80±3,7	0,003	15
8. Juodųjų serbentų antocianinų, 5 %	1,1±0,6	0,068	0,2	46±13	0,002	8,5
9. Juodųjų serbentų antocianinų, 5 % pasterizuotas	1,0±0,7	0,062	0,19	84±13	0,0036	15

**4 lentelė.** *Enterococcus faecalis* ląstelių skaičiaus pokyčiai skystoje terpėje su natūraliomis antimikrobinėmis medžiagomis

Terpė ir priedai	Po 24 h		
	tūkst. KSV/ml	padidėjimas lyginant su bandiniu be priedų, proc.	padidėjimas lyginant su pradiniu skaičiumi, kartų
1. Bandinys be priedų	30000±6600	-	750
2. Rozmarino ekstraktas, 0,1 %	0	0	0
3. Rozmarino ekstraktas, 0,05 %	70±2,6	0,23	1,75
4. Rozmarino ekstraktas, 0,01 %	100±60	0,33	2,5
5. Gelsvės ekstraktas, 0,1 %	4200±1900	14	105
6. Gelsvės ekstraktas, 0,05 %	9200±6600	30	230
7. Gelsvės ekstraktas, 0,01 %	16000±1300	53	400
8. Konservantas „NEBA“, 1 %	16000±7600	53	400

**5 lentelė.** Terpės sudėties įtaka ekstraktų frakcijų etanolinių tirpalų antimikrobinio poveikio stiprumui

Ekstraktas, frakcija		Slopinimo zonų plotis, mm			
Augalas	Koncentracija, proc.	<i>E. coli</i>		<i>Trichosporon cutaneum</i>	
		terpė be priedų	terpė su 1,5 % NaCl	terpė be priedų	terpė su 1,5 % NaCl
1. Mairūnas, metanolinis	10	12,66±0,47	12,66±0,47	12,00±0,00	8,83±0,23
	5	8,66±0,47	8,0±0,00	0	0
	1	0	0	0	0
2. Mairūnas, vandeninis	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
3. Mairūnas, acetoninis	10	13,66±0,47	11,00±0,00	10,00±7,00	11,00±0,00
	5	11,33±0,47	8,16±0,23	9,66±0,47	9,00±0,00
	1	9,16±0,23	0	8,00±0,00	8,00±0,00
4. Mairūno eterinis aliejus	10μl	40,00±0,00	40,00±0,00	40,00±0,00	40,00±0,00

**6 lentelė.** Kultivavimo temperatūros įtaka ekstraktų frakcijų antimikrobinio poveikio stiprumui

Ekstraktas	Koncentracija, proc.	Slopinimo zonų skersmuo, cm			
		<i>S. agona</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i> 18 h kult.	<i>B. subtilis sporos</i>
37 °C kultivavimo temperatūra					
Petražolės	10	0,0	1,4±0,1	0,5±0,3	1,4±0,0
	5	0,0	1,2±0,0	1,5±0,1	1,2±0,0
Gelsvės	10	0,0	2,0±0,1	1,5±0,1	1,6±0,2
	5	0,0	1,3±0,1	1,6±0,2	1,5±0,1
Rozmarino	10	1,2±0,1	2,6±0,1	1,8±0,1	2,1±0,1
	5	1,0±0,0	2,1±0,1	1,7±0,0	1,7±0,0
30 °C kultivavimo temperatūra					
Petražolės	10	0,0	1,3±0,0	1,7±0,3	1,3±0,1
	5	0,0	1,2±0,1	1,6±0,1	1,2±0,0
Gelsvės	10	0,0	1,8±0,0	1,5±0,0	1,4±0,0
	5	0,0	1,2±0,0	1,5±0,1	1,5±0,1
Rozmarino	10	0,9±0,0	2,6±0,3	1,8±0,2	2,1±0,3
	5	0,0	2,1±0,3	1,8±0,0	1,8±0,3
25 °C kultivavimo temperatūra					
Petražolės	10	0,9±0,1	1,5±0,0	1,4±0,1	1,6±0,2
	5	0,8±0,0	1,4±0,0	1,3±0,0	1,2±0,0
Gelsvės	10	0,9±0,1	2,9±0,2	2,5±0,1	1,7±0,0
	5	0,8±0,0	1,8±0,1	1,7±0,0	1,4±0,0
Rozmarino	10	0,8±0,0	4,0±0,0	2,3±0,0	1,9±0,2
	5	0,0	4,0±0,0	2,3±0,1	2,0±0,1

Tiriant kultivavimo sąlygų įtaką išbandyta 37, 30 ir 25 °C temperatūra bei kelios kultūros, paprastai auginamos 37 °C temperatūroje. *S. agona* buvo mažai jautri tirtiems ekstraktams, slopinimo zonų susidarymą 37 ir 30 °C temperatūroje lėmė tik rozmarinas, 25 °C temperatūroje visi ekstraktai sudarė tik minimalias slopinimo zonas (6 lentelė). *S. epidermidis* jautrumas 37 ir 30 °C temperatūroje beveik nesiskyrė, tačiau 25 °C temperatūroje slopinimo zonų vidurkis buvo apie 1,5 karto didesnis. Taigi, žemesnė temperatūra antimikrobinį ekstraktų poveikį sustiprina. Mažinant temperatūrą, 1,2–1,3 karto didėja zonos ir lėkštelėse su *B. subtilis* skirtumai. Visiškai kitoks vaizdas lėkštelėse su kultūros sporomis – ten skaidrių zonų pločio vidurkis vienodas visose temperatūrose, taigi ląstelės būseną turi įtakos kultūros jautrumui.

Augalų ekstraktų antimikrobinis poveikis yra baktericidinis, pasireiškiantis tiek sporų, tiek jaunų kultūrų atžvilgiu, nors poveikis sporoms daugeliu atvejų yra silpnesnis. Galima spėti, kad sporų būsenoje kultūra yra atspari tiriamoms medžiagoms, o jos veikia sporų dygimo metu, kuris prasideda šiek tiek vėliau, nei difunduoja ekstraktas. Jautrios rozmarinui buvo ir *B. subtilis* sporos, taip pat susidarė didelės slopinimo zonos, tačiau 8–10 % mažesnės, taigi rozmarino poveikis sporoms buvo šiek tiek silpnesnis. Gelsvės ekstraktas taip pat efektyviai slopino testavimo kultūros augimą, tačiau jos poveikis sporoms ir 18 h kultūrai nesiskyrė.

Petražolės šaknų ekstraktas taip pat slopina augimą, tačiau jaunos kultūros ir sporų jautrumas beveik nesiskiria. Taigi tik rozmarino ekstraktas skirtingai veikia sporas ir jauną kultūrą.

Palygintas jaunų 18 h kultūrų ir 5 paras išlaikytų kultūrų jautrumas antimikrobinėms medžiagoms. Nežymiai stipresnis nustatytas jaunai kultūrai – skaidrių zonų vidurkis didesnis 1,5 mm, o lyginant su kitomis testavimo kultūromis, jauna *S. typhimurium* kultūra sudarė didžiausias slopinimo zonas – vidurkis 17,4 mm.

Ekstraktų tirpalų pasterizacija susilpnino antimikrobines savybes, bandiniuose su pasterizuotu ekstraktu baktericidinis efektas nenustatytas.

Žemesnė tyrimo temperatūra antimikrobinį ekstraktų poveikį jaunoms kultūroms sustiprina. Mažinant temperatūrą didėja zonos skersmuo, skirtumai siekia – 1,2–1,3 karto, lėkštelėse su kultūros sporomis skaidrių zonų pločio vidurkis vienodas visose temperatūrose, taigi ląstelės būseną turi įtakos kultūros jautrumui.

## Išvados

1. Rozmarino, petražolės, gelsvės ekstraktų antimikrobinis poveikis yra baktericidinis, pasireiškiantis tiek *B. subtilis* sporų, tiek jaunų

kultūrų atžvilgiu, nors rozmarino ekstrakto poveikis sporoms yra silpnesnis.

2. *Salmonella typhimurium* 18 h kultūros ir 5 paras išlaikytos 17–20 °C temperatūroje kultūros jautrumas mėlynių, spanguolių, juodųjų serbentų uogų ir išspaudų antocianinams skiriasi, jaunos kultūros jautresnės.
3. Skirtingose – 37, 30 ir 25 °C temperatūrose antimikrobinis ekstraktų poveikis nevienodas. Mažinant bandymo temperatūrą lėkštelėse su jauna kultūra didėja slopinimo zonų skersmuo, taigi ir jautrumas. Lėkštelėse su kultūros sporomis skaidrių zonų pločio vidurkis vienodas visose temperatūrose, tyrimo temperatūra nedaro įtakos sporų jautrumui ekstraktams.

## Literatūra

1. **Jeong-Yong Cho, Jae-Hak Moon, Jong-Bang Eun.** Isolation and characterization of 3(Z)-dodecenedioic acid as an antibacterial substance from *Hovenia dulcis* Thunb // Food Science and Biotechnology. 2004. Vol. 13, No. 1. P. 46–50.
2. **Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., Karadogan T.** Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey // Food Control. 2004. Vol. 15, No. 3. P. 169–172.
3. **Na-Yeung Park, Kyung-Nam Park, Shin-Ho Lee.** Antimicrobial activities and food preservative effects of *Agrimoniae herba* // Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2004. Vol. 33, No. 2. P. 244–248.
4. **Song Yizhong, Kong Qiulian, Meng Xianjun, Chen Liuyong, He Jidong, Zhang Lili.** Study on inhibition activities of natural substance against microbes from minimally processed vegetables // Food Science and Technology. 2003. No. 4. P. 16–18.
5. **Negi P. S., Jayaprakasha G. K.** Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria by Carcinol and *Garcinia indica* extracts, and their Antioxidant Activity // Journal of Food Science. 2004. Vol. 69, No. 3. P. 61–65.
6. **Collado J., Fernandez A., Rodrigo M., Camats J.** Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores // Food Microbiology. 2003. Vol. 20, No. 5. P. 545–548.

*Autorius dėkingas VMS Fondui, prisidėjusiam finansuojant šiuos tyrimus.*

Pateikta spaudai 2005-04

A. Šarkinas

## DEPENDENCY OF THE SENSITIVITY OF BACTERIA TO ANTIMICROBIAL SUBSTANCES UPON THE PHYSIOLOGICAL STATE AND CULTIVATION TEMPERATURE OF THE CULTURES

### Summary

Antimicrobial properties of plant extracts were determined in vitro. Antimicrobial effects of plant extracts against *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) were determined by an agar diffusion test. The strains of bacteria were precultured into trypticase soy broth at 37 °C for 24 h. The extracts were tested in concentrations of 10 % and 5 %. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, after which the inhibition zones were measured with callipers and recorded in millimeters. All the tests were performed in triplicates. The intensity of antimicrobial efficacy was in the following order: *Rozmarinus officinalis* L., *Levisticum officinale* WDJ Koch and *Petroselinum sativum* Hoffm.

The minimum inhibitory concentration was defined as the concentration of extracts that prevented growth in all inoculated cultures. The inoculum was  $10^3$ – $10^5$  CFU/ml in this experiment. To determine the MIC of extracts against test-culture, extracts were added to the test medium at concentrations ranging from 0.01 % to 1 %.

**Keywords:** plant extracts, bacteria, antimicrobial properties.

A. Шаркинас

## ЗАВИСИМОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИМИКРОБНЫМ ВЕЩЕСТВАМ ОТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТЕСТ-КУЛЬТУР

### Резюме

Влияние возраста тест-культур на их чувствительность определяли методом диффузии в агар, в эксперименте применяли молодые 18-часовые

культуры и суспензию спор, смытую после 5-суточного культивирования. Продолжительность действия определенных веществ на тест-культуры определяли методом диффузии в агар через 24 ч после начала опыта и повторно после выдержки чашек Петри при комнатной температуре (17–20 °C) и повторного термостатирования. Минимальную бактерицидную концентрацию экстракта определяли в жидкой среде.

С применением тест-культуры *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) изучали антимикробные свойства экстрактов петрушки (*Petroselinum sativum* Hoffm), розмарина (*Rozmarinus officinalis* L.), зори (*Levisticum officinale* WDJ Koch). Методом диффузии в агар установили, что спиртовые растворы экстрактов подавляли рост бактерий. Чувствительными были как клетки 18-часовой культуры, так и споры бактерии, но диаметр прозрачных зон в чашках со спорами был на 8–10 % меньше. Экстракты петрушки и зори также обладали антимикробными свойствами, степень воздействия на клетки 18-часовой культуры, споры бактерий почти не различается.

Экстракты зори, петрушки, розмарина обладают бактерицидным действием, диаметр прозрачных зон после повторного термостатирования сохранился без изменений в большинстве случаев.

Экстракты более сильно подавляют клетки тест-культур 18-часовой культуры по сравнению с выдержанной 5 суток суспензией клеток тест-культуры.

Минимальная бактерицидная концентрация экстракта розмарина в отношении *Enterococcus faecalis* в жидкой среде составляет 0,1 %, меньшие концентрации и остальные экстракты только замедляют рост количества клеток по сравнению с контролем.