

Vaistinės dirvuolės ekstraktų frakcijų antimikrobinio aktyvumo įvertinimas

A. Šarkinas, Z. Rekštienė

KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; direktorius@lmai.lt

A. Šipailienė, P. R. Venskutonis

Kauno technologijos universitetas, Radvilėnų pl. 19, LT-50254 Kaunas

Augalų ekstraktų ir eterinių aliejų antibakteriniam aktyvumui įvertinti naudotos maisto produktuose nepageidautinos, tarp jų ir patogeninių bakterijų, kultūros. Pasirinktos aštuonios testavimo kultūros: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes*, bei aštuonios mielių rūšys (*Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula rubra*), išskirtos pieno perdirbimo įmonėse. Antibakterinis aktyvumas įvertintas difuzijos į agarą metodu bei skystoje terpėje.

Vaistinės dirvuolės ekstrakto frakcijos pasižymėjo skirtingu efektyvumu. Vandeningas ekstraktas stabdė tik gramteigiamų bakterijų augimą, visiškai neslopindamas gramneigiamų bakterijų. Kultūros kiekis terpėje turėjo mažai įtakos rezultatams – tik dalyje mėginių zonų skersmuo mažėjo augant ląstelių skaičiui terpėje.

Vaistinės dirvuolės vandeniniai ekstraktai turėjo antimikrobinę savybę ir slopino iš raugintų pieno produktų išskirtų mielių augimą.

Ektrakto priedai skystoje terpėje taip pat turėjo antimikrobinę savybę, sumažino mielių ir bakterijų ląstelių skaičių, bet bandyme panaudota 3 % koncentracija nebuvo baktericidinė, ląstelių skaičius labiausiai sumažėjo ekspozicijos pradžioje, tolimesnio laikymo metu pokyčiai mažesni.

Acetoniniai ir metanoliniai ekstraktai buvo efektyvūs bakterijų kultūrų atžvilgiu, bet neveikė mielių kultūrų.

Raktažodžiai: vaistinė dirvuolė (*Agrimonia eupatoria* L.), ekstraktai, antimikrobinės savybės.

Įvadas

Vaistinė dirvuolė (*Agrimonia eupatoria* L.) yra daugiamečiai 30–120 cm šiek tiek kvepiantis žolinis augalas, žydi liepą–rugpjūtį, vaisiai sunoksta rugpjūtį–rugsėjį, paplitęs Europoje ir Azijoje, Lietuvoje auga sausose pievose, dirvonuose, šlaituose, dažnas. Vaistinės dirvuolės masėje kaupiasi raugai, polisacharidai, triterpenai, flavonoidai, eteriniai aliejai, taigi galima tikėtis, kad ir šio augalo ekstraktai turės antimikrobinę savybę [1].

Džiovinami augalai, tarp jų prieskoniniai, be savo natūralios mikrofloros būna užkrėsti ir enterobakterijomis, tarp kurių pasitaiko netgi salmonelių, kampilobakterijų, jersinijų. Per 10 metų ištyrus 5754 mėginius, salmonelių rasta 4 %. Prieskonius perdirbimo, saugojimo, transportavimo metu gali užteršti graužikai, vabzdžiai, paukščiai, ypač gaminant juos pietiniuose regionuose, kur

džiovinama lauko sąlygomis. Tarp išskirtų salmonelių 99,5 % sudaro priklausiančios *Salmonella enterica* subsp. *enterica* porūšiui, kuriame identifikuoti 1504 serovarai. Salmonelės aptikti prieskonių mėginiuose sunku dėl jų netolygaus pasiskirstymo produkto masėje, todėl ypač svarbus mėginių paėmimas [2]. Prieskonių į dešrelės dedama 0,5–2 %, jie dažnai būna užteršti mikrobais, nepaisant to, 1 % juodųjų pipirų priedas padeda pasiekti konservuojantį efektą. Psichrotrofinių mikroorganizmų skaičius, nustatytas auginant pasėlius 7 °C temperatūroje 10 dienų, po mėginių laikymo 16 parų (2±1) °C temperatūroje yra mažesnis apie 13 % [3].

Pašalinių mikroorganizmų pakliuvimo su prieskoniais galima išvengti vartojant jų ekstraktus. Prieskoniniai ekstraktai, eteriniai aliejai turi antimikrobinę poveikį maisto produktuose ir

modelinėse sistemose, nors terminis apdorojimas kartais jų efektyvumą sumažina [4–6].

Kai kurių rūšių mėsa labiau jautri gedimui. Stručio mėsai būdingas didesnis pH, polinesočių riebalų rūgščių kiekis, baltymų ir geležies kiekis, mažesnis riebalų ir cholesterolio kiekis lyginant su vištiena ar jautiena sudaro palankesnes sąlygas pašalinei mikroflorai augti. Natrio laktatas vartojamas saugojimo laikui prailginti, nes slopina mikroorganizmų augimą. Rozmarino (*Rosmarinus officinalis* L.) ekstraktas turi antioksidacinį poveikį, kuris pasireiškia ir saugant mėsą modifikuotoje atmosferoje, padeda stabilizuoti spalvines savybes, o natrio laktatas turi bakteriostatinį efektą, jų mišiniui būdingas sinerginis efektas stabilizuojant mikrobiologinius rodiklius ir padeda pailginti saugojimo laiką bent trimis paromis [7].

Pagrindiniai šalavijo aktyvūs komponentai yra bornil-acetatas, β -kariofilenas, α -pinenas. Eterinis aliejus neveikia eukariotinių mikroorganizmų, bet efektyviai slopina gramteigiamas bakterijas, minimali inhibicinė koncentracija yra 35–45 $\mu\text{g/ml}$. Analizuojant šių medžiagų poveikio mechanizmą nustatyta, kad jų toksinis poveikis pasireiškia fermentų inhibavimu, kaip β -gliukozidazės, β -gliukuronidazės, ksantinoksi-dazės [8].

Dašio ekstrakte yra medžiagų, efektyviai slopinančių mikromicetus *Alternaria* ir *Botrytis*. Veikiant ekstraktui slopinamas micelio augimas, pasireiškia ir fungicidinis efektas [9].

Clostridium perfringens augimą slopino rozmarino, česnako, svogūno ekstraktai, maltoje mėsoje sulėtėjo augimas, sporuliacija ir enterotoksinų gamyba, tačiau žaliosios paprikos ekstraktas maltoje mėsoje paskatino testavimo kultūros augimą [10].

Tyrimų tikslas – įvertinti vaistinės dirvuolės ekstraktų antimikrobinį efektyvumą palyginant vandeninius, acetoninius ir metanolinius ekstraktus.

Tyrimų objektai ir metodai

Vaistinės dirvuolės ekstraktų antibakteriniam aktyvumui įvertinti vartotos maisto produktuose nepageidautinų bakterijų, tarp jų ir patogeninių, kultūros. Pasirinktos aštuonios testavimo kultūros: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes* bei aštuonios mielių rūšys (*Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* H67, 12R, *Candida*

parapsilosis, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula rubra*).

Augalų metanoliniai ir acetoniniai ekstraktai paruošti automatiniu ekstraktoriumi (*Kret controlise Kika werke, Stanfen*, Vokietija). Ekstrakcijai paimta 10 g malto augalo ir ekstrahuota pasirinktu tirpikliu (150 ml acetonu arba 120 ml metanoliumi). Ekstraktoriaus maišyklės greitis – 200 min^{-1} . Procesas vyko 3 ciklais. Kiekvienas ciklas turėjo 3 etapus: tirpiklio temperatūros kėlimas iki virimo (acetonui temperatūra kelta iki 70 °C, o metanoliumi – iki 90 °C); ekstrakcija 40 min; vėsinimas iki 40 °C. Gauti ekstraktai koncentruoti vakuuminiam rotaciniame garintuve („*Rotovator R-114*“, *BÜCHI*, Šveicarija). Ekstraktai baigti džiovinti iki sausumo azoto srove.

Vandeninių augalų ekstraktų paruošimas: 10 g tiriamo sauso augalo žaliavos užpilama 150 ml karšto (100 °C) vandens ir ekstrahuota purtyklėje („*Mylab – Platform Shaker Universal PSU 20*“, *BioSan*) 2 valandas. Po to gautas mišinys filtruojamas *Biuchnerio* piltuvu. Nuo ekstrakto atskirta žolė vėl užpilama 100 ml karšto (100 °C) vandens ir ekstrahuojama dar 2 valandas. Gautas mišinys vėl nufiltruojamas *Biuchnerio* piltuvu. Surinktas ekstraktas koncentruojamas iki sausumo liofilizatoriuje (*MAXI dry lyo, Jonan Nordic*, Danija, šaldytuvas *Heto dry WINNER CT/DW*, Danija, vakuuminis siurblys *RZ 2, GMBH+CO*, Vokietija).

Antibakterinį aktyvumą vertinant difuzijos į agarą metodu bakterijų kultūros 18 h augintos 37 °C ant nuožulnaus agaro. Nuplauta bakterijų suspensija praskiesta pagal Mc Farlando standartą Nr. 0,5, gerai sumaišyta mini purtykle ir įpilta į ištirpintą ir atvėsintą iki 47 °C temperatūros agarizuotą terpę bendram bakterijų skaičiui nustatyti. Dar kartą gerai sumaišyta iki tolygaus ląstelių pasiskirstymo. Tokiu būdu paruošta bakterijų ląstelių ir terpės mišinio suspensija išpilstyta po 10 ml į 90 mm skersmens stiklines Petri lėkšteles. Terpei sustingus, joje padarytos 6 įdubos (8 mm skersmens), į kurias įpilta po 50 μl 50 %, 10 % ir 1 % etanolinių ekstraktų tirpalų.

Mielių kultūros augintos 25 °C temperatūroje parą ant nuožulnaus bulvių–gliukozės agaro (LAB 98, LAB M). Po paros užaugusios mielių kultūros nuo agaro nuplautos steriliu fiziologiniu tirpalu ir pagal Mc Farlando standartą Nr. 1 paruošta ląstelių suspensija supilta į ištirpintą ir atvėsintą bulvių–gliukozės (LAB 98, LAB M) agarizuotą terpę bei gerai išmaišyta. Tokiu būdu paruošta bakterijų ir mielių ląstelių bei terpės suspensija išpilstyta po 10 ml į 90 mm skersmens Petri lėkšteles. Terpei sustingus, joje padarytos 6 įdubos (8 mm skersmens), į kurias įpilta tiriamieji tirpalai.

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

Vertinant testavimo kultūrų fiziologinės būklės įtaką jautrumui, su agaru maišyta 18 h kultūra ir sporos. Sporų suspensijai paruošti *B. subtilis* kultūra sėta ant nuožulnaus agaro ir inkubuota 5 paras 37 °C temperatūroje. Nuplauta nuo nuožulnaus agaro *B. subtilis* suspensija mėgintuvėlyje pasterizuota 10 min 80 °C temperatūroje, prieš naudojant skiesta iki reikiamo drumstumo pagal Mc Farlando standartą Nr. 0,5.

Nustatant ekstraktų poveikį skystoje terpėje, į 10 ml smegenų ir širdies sultinio įpilta 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 laikyti kambario temperatūroje ar termostate. Ląstelių skaičiaus dinamika stebėta sėjant ir nustatant jų skaičių (KSV/ml) po 24 ir 48 valandų.

Minimaliai baktericidinei koncentracijai nustatyti į 10 ml smegenų ir širdies sultinio įpilta 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 laikyti 15–20 °C temperatūroje. Antimikrobinis efektas vertintas lyginant bakterijų skaičių tiriamuose mėginiuose, terpėje be priedų ir terpėje su 0,5 ml etanolio ląstelių skaičių nustatant po 24 ir 48 valandų. Nenustačius baktericidinio efekto ir užaugus tam tikram ląstelių skaičiui, apskaičiuotas inhibicijos efektyvumas, t. y. kiek procentų mažiau gyvų ląstelių rasta tiriamajame mėginyje lyginant su terpe be ekstraktų priedų.

Rezultatai ir jų aptarimas

Analizuojant vaistinės dirvuolės vandeninių ekstraktų antimikrobinį efektyvumą difuzijos į agarą metodu bandytos kelios testavimo kultūros koncentracijos. Gauti duomenys rodo, kad ekstraktas stabdo dalies testavimo kultūrų augimą, veiksmingos yra abi bandytos 5 ir 10 % etanolinio tirpalo koncentracijos, tačiau iš 1 lentelės matome, kad vandeniniam ekstraktui visiškai atsparios gramneigiamos bakterijos, o skaidrios zonos susidaro tik lėkštelėse su gramteigiamomis kultūromis. *S. aureus* yra jautrus ekstraktui, beveik nėra skirtumo

tarp 5 ir 10 % ekstrakto tirpalo poveikio. Kultūros koncentracija terpėje taip pat neturi įtakos skaidrių zonų skersmeniui. Dėl 10 % etanolinio ekstrakto tirpalo koncentracijos susidarė vienodo skersmens zonos lėkštelėse su skirtingu testavimo kultūros ląstelių skaičiumi, tik lėkštelėje su 0,3 ml kultūros veikiant 5 % tirpalui zonos buvo mažesnės.

Bandyme su *B. cereus* tendencijos priešingos – dėl 10 % koncentracijos tirpalo lėkštelėse su mažiausiu kultūros kiekiu zonų skersmuo didesnis, panašūs rezultatai gaunami ir su *M. luteus* bei *L. monocytogenes* kultūromis.

1 lentelė. Vaistinės dirvuolės vandeninio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas

Testavimo kultūra		Ektrakto tirpalo koncentracija, proc.	
Pavadinimas	Tūris lėkštelėje, ml	5	10
		Slopinimo zonų skersmuo, mm	
1. <i>S. aureus</i>	0,1	16,33±0,47	16,33±0,47
	0,2	17,00±0,81	16,33±0,47
	0,3	14,66±0,47	16,33±0,47
2. <i>P. aeruginosa</i>	0,1	0,00	0,00
	0,2	0,00	0,00
	0,3	0,00	0,00
3. <i>E. coli</i>	0,1	0,00	0,00
	0,2	0,00	0,00
	0,3	0,00	0,00
4. <i>E. aerogenes</i>	0,1	0,00	0,00
	0,2	0,00	0,00
	0,3	0,00	0,00
5. <i>B. cereus</i>	0,1	16,33±0,47	19,00±0,81
	0,2	16,66±0,47	17,83±0,84
	0,3	16,33±0,47	17,83±0,23
6. <i>M. luteus</i>	0,1	22,33±0,94	26,33±0,47
	0,2	23,66±0,94	26,33±1,69
	0,3	23,66±0,47	24,50±0,40
7. <i>L. monocytogenes</i>	0,1	11,33±0,94	13,33±0,47
	0,2	12,33±0,47	12,33±0,47
	0,3	10,00±0,00	10,00±0,00

Tokios koncentracijos tirpalai slopino ir dalies mielių kultūrų augimą (2 lentelė). Pramoninės *S. cerevisiae* rasės H67 ir K7 buvo atsparios vaistinės dirvuolės ekstrakto poveikiui, kaip iš pieno produktų išskirta kultūra *S. cerevisiae*. Kolekcinė kultūra *S. cerevisiae* ir rasė 12R buvo jautrios kaip ir išskirtos iš raugintų pieno produktų mielės ir sudarė skaidrias zonas, kurių skersmuo siekė 13–19 mm.

2 lentelė. Vaistinės dirvuolės vandeninio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas mielių kultūroms

Testavimo kultūra		Ekstrakto tirpalo koncentracija, proc.	
Pavadinimas	Tūris lėkštelėje, ml	5	10
		Slopinimo zonų skersmuo, mm	
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 12R	0,2	15,66±1,69	16,66±0,47
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> H67	0,2	0,00	0,00
3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> K7	0,2	0,00	0,00
4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (kolekcinė)	0,2	15,66±1,69	18,66±0,94
5. <i>Torulaspora delbrueckii</i>	0,2	13,00±1,40	16,00±0,00
6. <i>Rhodotorula rubra</i>	0,2	19,66±0,47	23,83±0,94
7. <i>Pichia kluyveri</i>	0,2	15,66±1,25	18,00±0,81
8. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,2	0,00	0,00
9. <i>Candida parapsilosis</i>	0,2	16,66±0,94	17,66±1,24

Siekiant nustatyti ekstrakto baktericidinę dozę skystoje terpėje bandytos koncentracijos 0, 1 ir 3 % lyginant *B. subtilis* vegetatyvinių ląstelių ir sporų skaičiaus dinamiką 4–6 °C temperatūroje. Gauti rezultatai rodo, kad labiausiai ląstelių skaičius sumažėja per pirmąsias 2 h – terpėje su 1 % ekstrakto vegetatyvinių ląstelių skaičius sumažėjo 1500 kartų, o su 3 % – 3000 kartų, toliau iki 24 h ląstelių skaičius beveik nekito, sumažėjo apie 1,5 karto. Terpėje be ekstrakto ląstelių skaičius laikymo metu taip pat mažėjo, bet lėčiau. *B. subtilis* sporos yra atsparesnės ir ekstraktui, per 2 h sumažėja tik apie 3 kartus, terpėje be ekstrakto svyruoja pradiniam lygyje.

Kitų rūšių bakterijos taip pat yra veikiamos ekstrakto (4 lentelė). Gramneigiamos *S. typhimurium* kultūros ląstelių skaičius sumažėja 5–8 kartus, jų skaičius mažėja ir terpėje be ekstrakto, bet lėčiau. Ekstraktas efektyviau slopina *L. monocytogenes* ląsteles, per 2 h jų skaičius sumažėja apie 40 kartų, toliau laikant lieka beveik be pakitimų.

Nevienodas vaistinės dirvuolės ekstrakto poveikis ir mielių kultūroms. *R. rubra* kultūros ekspozicijos metu terpėje su ekstraktu ląstelių žuvimo procesas gana greitas – per 2 h sumažėja apie 60 kartų. Ši mielių kultūra yra psichrotrofinė, gali augti ir žemoje temperatūroje, tai ir pastebima tolimesnio laikymo metu, nes ląstelių skaičius šiek tiek padidėja, tikėtina, kad išlikusios gyvos pradiniam etape ląstelės vėliau gali pradėti daugintis. Terpėje be ekstrakto kultūros ląstelių skaičius sumažėja nežymiai. Kolekcinės *S. cerevisiae* kultūros ląstelių skaičius abiem terpės variantais išsilaiko pradiniam lygyje, taigi yra atspari ekstraktui.

Pagaminti ir acetoniniai bei metanoliniai vaistinės dirvuolės ekstraktai. Difuzijos į agarą metodu nustatytas jų slopinantis poveikis bakterijų testavimo kultūroms, bet visiškai nebuvo slopinamas mielių kultūrų augimas.

3 lentelė. Vaistinės dirvuolės vandeninio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas *B. subtilis* ląstelėms ir sporoms smegenų-širdies sultinyje

Ekstrakto kiekis	Laikas, h	Skaičius, KSV/ml			
		<i>Bacillus subtilis</i> vegetatyvinės ląstelės		<i>Bacillus subtilis</i> sporos	
		Skaičius	Sumažėjimas, kartai	Skaičius	Sumažėjimas, kartai
0,1	0	$(6,9\pm 1,1)\cdot 10^7$	–	$(7,0\pm 1,7)\cdot 10^6$	–
	2	$(4,4\pm 1,3)\cdot 10^4$	1568,0	$(2,0\pm 0,6)\cdot 10^6$	3,5
	24	$(2,5\pm 0,7)\cdot 10^4$	2,0	$(1,4\pm 0,5)\cdot 10^6$	1,4
0,3	0	$(6,9\pm 1,1)\cdot 10^7$	–	$(7,0\pm 1,7)\cdot 10^6$	–
	2	$(2,3\pm 0,6)\cdot 10^4$	3000,0	$(2,1\pm 0,3)\cdot 10^6$	3,3
	24	$(1,8\pm 0,5)\cdot 10^4$	1,0	$(2,4\pm 0,5)\cdot 10^6$	–
0,0	0	$(6,9\pm 1,1)\cdot 10^7$	–	$(7,0\pm 1,7)\cdot 10^6$	–
	2	$(3,0\pm 1,3)\cdot 10^6$	23,0	$(1,0\pm 0,3)\cdot 10^7$	–
	24	$(1,2\pm 0,3)\cdot 10^5$	25,0	$(4,0\pm 1,6)\cdot 10^6$	–

4 lentelė. Vaistinės dirvuolės vandeninio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ląstelėms smegenų-širdies sultinyje

Ekstrakto kiekis	Laikas, h	Skaičius, KSV/ml			
		<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
		Skaičius	Sumažėjimas, kartai	Skaičius	Sumažėjimas, kartai
0,1	0	$(1,3 \pm 0,7) \cdot 10^7$	–	$(9,2 \pm 3,1) \cdot 10^7$	–
	2	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^6$	8,6	$(2,8 \pm 2,3) \cdot 10^6$	33,0
	24	$(3,7 \pm 1,3) \cdot 10^6$	–	$(3,5 \pm 1,7) \cdot 10^6$	–
0,3	0	$(1,3 \pm 0,7) \cdot 10^7$	–	$(9,2 \pm 3,1) \cdot 10^7$	–
	2	$(2,4 \pm 0,6) \cdot 10^6$	5,4	$(2,4 \pm 1,6) \cdot 10^6$	38,0
	24	$(3,0 \pm 1,3) \cdot 10^6$	–	$(2,3 \pm 1,5) \cdot 10^6$	–
0,0	0	$(1,3 \pm 0,7) \cdot 10^7$	–	$(9,2 \pm 3,1) \cdot 10^7$	–
	2	$(6,0 \pm 1,9) \cdot 10^6$	2,2	$(2,0 \pm 1,3) \cdot 10^6$	46,0
	24	$(3,9 \pm 1,3) \cdot 10^6$	1,5	$(8,2 \pm 3,4) \cdot 10^5$	2,4

5 lentelė. Vaistinės dirvuolės vandeninio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas mielių kultūroms smegenų-širdies sultinyje

Ekstrakto kiekis	Laikas, h	Skaičius, KSV/ml			
		<i>Rhodotorula rubra</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		Skaičius	Sumažėjimas, kartai	Skaičius	Sumažėjimas, kartai
0,3	0	$(1,2 \pm 0,7) \cdot 10^6$	–	$(1,0 \pm 0,5) \cdot 10^5$	–
	2	$(2,1 \pm 1,2) \cdot 10^4$	57	$(1,4 \pm 0,7) \cdot 10^5$	–
	24	$(1,8 \pm 0,8) \cdot 10^5$	–	$(1,5 \pm 1,1) \cdot 10^5$	–
0,0	0	$(1,2 \pm 0,7) \cdot 10^6$	–	$(1,0 \pm 0,5) \cdot 10^5$	–
	2	$(4,0 \pm 1,6) \cdot 10^5$	3	$(2,0 \pm 1,3) \cdot 10^5$	–
	24	$(3,2 \pm 1,3) \cdot 10^5$	–	$(1,6 \pm 0,6) \cdot 10^5$	–

6 lentelė. Vaistinės dirvuolės metanolinio ir acetoninio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas

Ekstraktas		Slopinimo zonų skersmuo, mm					
Tirpiklis	Koncentracija, proc.	<i>Bacillus subtilis</i> sporos	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella agona</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Metanolinis	10	32,0±0,0	31,5±0,7	19,0±0,0	24,0±0,0	25,0±0,0	27,0±0,0
	5	26,0±1,4	24,5±0,7	13,5±2,1	13,5±2,1	25,5±0,7	24,0±1,4
	1	22,0±0,0	21,5±0,7	13,5±0,7	14,0±1,4	21,0±1,4	25,0±1,4
Acetoninis	10	25,0±0,0	23,0±0,0	28,0±0,0	16,0±0,0	28,0±0,0	27,0±0,0
	5	16,5±0,7	16,0±1,4	15,5±0,7	12,5±2,1	20,0±5,7	21,5±0,7
	1	15,0±0,0	14,5±0,7	11,5±0,7	13,0±1,4	17,0±2,8	20,0±2,8

7 lentelė. Vaistinės dirvuolės metanolinio ir acetoninio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas mielių kultūroms difuzijos į agarą metodu

Ekstraktas		Slopinimo zonų skersmuo, mm					
Tirpiklis	Koncentracija, proc.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H67	<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 12R	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K 7	<i>Rhodotorula rubra</i>
Metanolinis	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acetoninis	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Apibendrinant gautus rezultatus galima pastebėti, kad vaistinės dirvuolės ekstrakto frakcijos pasižymi skirtingu efektyvumu. Vandeninis ekstraktas stabdo tik gramteigiamų bakterijų augimą, visiškai neslopindamas gramneigiamų bakterijų. Kultūros kiekis terpėje turi mažai įtakos rezultatams – tik dalyje mėginių zonų skersmuo mažėjo augant ląstelių skaičiui terpėje.

Vaistinės dirvuolės vandeniniai ekstraktai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis ir slopina iš raugintų pieno produktų išskirtų mielių augimą.

Ektrakto priedai skystoje terpėje taip pat pasižymi antimikrobinėmis savybėmis, sumažina mielių ir bakterijų ląstelių skaičių, bet bandymui panaudota 3 % koncentracija nebuvo baktericidinė, ląstelių skaičius labiausiai sumažėja ekspozicijos pradžioje, tolimesnio laikymo metu pokyčiai mažesni.

Acetoniniai ir metanoliniai ekstraktai yra efektyvūs bakterijų kultūrų atžvilgiu, bet neveikia mielių kultūrų.

Išvados

1. Vaistinės dirvuolės vandeninių, acetoninių ir metanolinių ekstraktų antimikrobinis efektyvumas skirtingas.
2. Kultūros kiekis terpėje turėjo mažai įtakos rezultatams, tik mėginyje su *Staphylococcus aureus* tiriant vandeninį vaistinės dirvuolės ekstraktą slopinimo zonų skersmuo mažėjo didėjant ląstelių skaičiui terpėje.
3. Vandeninis ekstraktas slopino mielių ir gramteigiamų bakterijų augimą, bet neveikė gramneigiamų bakterijų.
4. Skystoje terpėje vaistinės dirvuolės ekstraktas sumažino mielių ir bakterijų ląstelių skaičių nuo 1,5 iki 3000 kartų, tačiau ir naudota didžiausia 3 % koncentracija nebuvo baktericidinė.
5. Acetoniniai ir metanoliniai vaistinės dirvuolės ekstraktai buvo efektyvūs bakterijų kultūrų atžvilgiu, slopino *Bacillus subtilis* vegetatyvinių ląstelių ir sporų, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella agona*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* augimą, bet neslopino mielių *Saccharomyces cerevisiae* H67, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* 12R, *Saccharomyces cerevisiae* K7, *Rhodotorula rubra* augimo.

Literatūra

1. Ragažinskienė O., Rimkienė S., Sasnauskas V. Vaistinių augalų enciklopedija. Kaunas: Lututė, 2005. 440 p.
2. Hartwig H., Schlässer A., Rabsch W., Beckmann G. Salmonellen in Kräutern und Gewürzen // Fleischwirtschaft. 2006. Vol. 3. P. 150–154.

3. Martinez L., Cillia I., Beltran J., A., Roncales P. Effect of Capsicum annum (Red Sweet and Cayenne) and Piper nigrum (Black and White) Pepper Powders on the Shelf Life on Fresh Pork Sausages Packaged in Modified Atmosphere // Journal of Food Science. 2006. Vol. 71, No. 1. P. S48–S53.
4. Dwivedi S., Vasavada M. N., Cornforth D. Evaluation of Antioxidant Effects and Sensory Attributes of Chinese 5-Spice Ingredients in Cooked Ground Beef // Journal of Food Science. 2006. Vol. 71, No. 1. P. C12–C17.
5. Guynot M. E., Ramos A. J., Seto I., Puroy P., Sanchis V., Marin S. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products // J. Appl. Microbiol. 2003. No. 94 (5). P. 893–899.
6. Ozkan G., Sagdic O., Ozcan M. Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations // Food Sci. Technol. Int. 2003. Vol. 9 (2). P. 85–88.
7. Atif C. Seydim, Zeynep B., Guzel-Seydim, Jim C. Acton, Paul L. Dawson Effects of Rosemary Extract and sodium Lactate on Quality of Vacuum-packaged Ground Ostrich Meat // Journal of Food Science. 2006. Vol. 71, No. 1. P. S71–S75.
8. Garcija-Vallejo M. C., Moujir L., Burillo J. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Salvia canariensis* // Flavour and Fragrance Journal. 2006. No. 21 (2). P. 277–281.
9. Boyraz N., Ozcan M. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) // International Journal of Food Microbiology. 2006, No. 107 (3). P. 238–242.
10. Omar S. S., Al-Delaimy K. S., Abdullah Z. A. The inhibitory effect of Jordanian selected plant extracts on growth and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* // Advances in Food Sciences. 2006. Vol. 28 (1). P. 23–28.

Pateikta spaudai 2006-10

A. Šarkinas, Z. Rekštienė, A. Šipailienė,
P. R. Venskutonis

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF AGRIMONY (*AGRIMONIA EUPATORIA* L.) EXTRACTS

Summary

The antimicrobial properties of agrimony extracts are established against a wide spectrum of microbes including bacteria: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes* and yeasts: *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Saccharomyces*

cerevisiae, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri* and *Rhodotorula rubra*.

Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) can be found growing extensively where throughout Europe, Canada, and the United States. It is a hardy perennial plant which grows in such natural habitats as woods and fields; it can also be easily cultivated. Agrimony contains a bitter substance, tannin (the yield approx. 5%), flavonoids and a volatile essential oil. Agrimony has an old reputation as a popular, domestic medicinal herb.

The antimicrobial properties of the acetone, methanol and aqueous extracts of agrimony were assessed by the agar diffusion method. It was found that agrimony water extract was effective against gram positive bacteria and did not possess inhibitory effect against gram negative bacteria. *Micrococcus luteus* appeared to be the most sensitive of the gram positive bacteria to this extract.

All tested bacteria were affected by the methanol and acetone extracts of agrimony. *B. cereus* vegetative cells and spores of *S. enteritidis*, *S. agona* and *Listeria monocytogenes* were more sensitive to the acetone extract of agrimony compared to the methanol extract. The strongest effect on *S. typhimurium* was obtained with acetone extract.

All tested yeast cultures were sensitive to water extract of agrimony except for *Saccharomyces cerevisiae* which was isolated from milk. Methanol and acetone extracts of agrimony did not possess antimicrobial properties in the tested yeast cultures.

Keywords: bacteria, yeasts, antimicrobial activity, plant extracts, *Agrimonia eupatoria*.

А. Шаркинас, З. Рякштене, А. Шипайлене,
П. Р. Вянскутонис

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ АГРИМОНИИ (*AGRIMONIA EUPATORIA* L.)

Резюме

С применением тест-культур *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes*, *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula rubra* изучали антимикробные свойства экстрактов агримонии методом диффузии в агар и в жидкой среде.

Водный экстракт агримонии подавлял рост грамположительных бактерий, не действуя на грамотрицательные бактерии, количество тест-культуры в среде не повлияло на диаметр прозрачных зон в чашках, только в части образцов диаметр зон увеличился с уменьшением содержания клеток.

Водный экстракт агримонии обладал антимикробным действием и подавлял рост дрожжей, выделенных на предприятиях молочной промышленности.

В жидкой среде экстракт агримонии также обладал антимикробным действием и снижал количество клеток дрожжей и бактерий, но для достижения бактерицидного эффекта необходимо увеличить содержание экстракта, так как примененная 3%-ная концентрация эффективна только в начале экспозиции.

Ацетонные и метанольные экстракты агримонии подавляют рост бактерий, но неэффективны против дрожжей.