

Osetljivost *Salmonella* Enteritidis na odabrane aktivne sastojke eteričnih ulja u uslovima *in vitro*

Radomir Ratajac^{1*}, Dragica Stojanović¹, Milanka Jezdimirović²,
Branislav Lako³, Dušan Orlić¹, Igor Stojanov¹
¹Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Novi Sad
²Fakultet za veterinarsku medicinu, Beograd
³Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Kratak sadržaj

Preventiva i terapija infektivnih bolesti životinja, naročito zoonoza, je neophodna uprkos unapređenju tehnike proizvodnje i higijene klanja, a bezbednost hrane je značajan parametar za zdravlje ljudi. Upotreba antibakterijskih lekova nosi sa sobom opasnosti kao što su razvoj rezistentnih sojeva bakterija na pojedine antibiotike, naročito onih koji su zajednički za primenu kod životinja i ljudi, i njihovih rezidua u životinjskim namirnicama. Mogući alternativni prilaz ovoj terapiji je primena eteričnih biljnih ulja koja ispoljavaju antimikrobno delovanje. Cilj rada je bio da se ispita antimikrobna aktivnost eugenola, cinamaldehida, timola i karvakrola primenjenih pojedinačno ili u međusobnim kombinacijama protiv *Salmonella* Enteritidis u *in vitro* uslovima. Izbor bakterije je izvršen prema značaju njenog prisustva u namirnicama za ljudsku ishranu, odnosno činjenice da se prenosi sa životinja na ljude. Antibakterijski potencijal odabranih aktivnih sastojaka eteričnih ulja, kao i njihovih kombinacija protiv izolovanog soja *Salmonella* Enteritidis (iz biološkog materijala poreklom od živine) dobijen je određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) agar dilucionim testom. Dobijeni rezultati pokazuju da je MIK eugenola (određen agar dilucionom metodom), kao i kombinacije eugenola sa cinamaldehydom (2:1) za ovaj serotip salmonela iznosila je 0,625 µl/ml. Cinamaldehyd i smeša timola i karvakrola (1:1) su u manjoj koncentraciji, 0,312 µl/ml podloge, zaustavile razmnožavanje *S. Enteritidis*. Najjaču antibakterijsku aktivnost imali su timol i karvakrol, a njihov MIK je bio 0,156 mg/ml, odnosno µl/ml. Na osnovu izvršenih *in vitro* ispitivanja, možemo se zaključiti da testirana eterična ulja delimično ili potpuno zaustavljaju razmnožavanje *S. Enteritidis*, te se mogu koristiti kao antibakterijski fitofarmaci u veterinarskoj medicini.

Ključne reči: pilići, *Salmonella*, eterična ulja, rezistencija

* e-mail: rataiac@niv.ns.ac.yu

Sensitivity of *Salmonella Enteritidis* to selected active constituents of essential oils in *in vitro* conditions

Radomir Ratajac^{1*}, Dragica Stojanović¹, Milanka Jezdimirović²,
Branislav Lako³, Dušan Orlić¹, Igor Stojanov¹

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad

²Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade

³Faculty of Agriculture, Novi Sad

Abstract

In spite of modern improvements in slaughter hygiene and food production techniques, prevention and therapy of infective animal diseases, especially zoonosis, is necessary because food safety has been an increasingly important public health issue. Using chemotherapeutic drugs against pathogen microorganisms raises the possibility of developing resistance of bacteria (common for animals and humans) to certain drugs. Another important issue is presence of drug residues in food of animal origin. The use of essential oils (EOs) is a possible alternative to synthetic drugs, because of their antibacterial effect. The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of essential oils – eugenol, cinnamaldehyde, thymol and carvacrol, individually as well as when combined, against field strain *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, serotype Enteritidis (SE/*in vitro* conditions). Determining antimicrobial potential of essential oils, as well as their combinations against the strain of SE (biological material originating from poultry), was carried out through determining minimal inhibitory concentration (MIC) using agar dilution test. MIC (determined by agar dilution method) of eugenol, and combination of eugenol and cinnamaldehyde (2:1) was 0.625 µl/ml. Cinnamaldehyde and mixture of thymol and carvacrol (1:1) resulted in growth inhibition of SE at 0.312 µl/ml medium. Thymol and carvacrol had the best antibacterial activity and their MIC was 0.156 mg/ml, i.e. µl/ml. It can be concluded that the selected EOs partly or totally inhibited growth of SE and that they can be used in veterinary medicine, possibly as phytopharmaceuticals.

Key words: chickens, *Salmonella*, ethereal oil, resistance

UVOD

Antibiotici imaju veliki značaj u humanoj i veterinarskoj medicini. Koriste se za lečenje različitih bolesti ljudi i životinja, kao i za povećanje produktivnih

karakteristika kod farmških životinja. Međutim, upotreba antibiotika u borbi sa patogenim mikroorganizmima nosi sa sobom i opasnosti, kao što su razvoj rezistentnih sojeva bakterija, poremećaj normalne bakterijske flore i mogućnost nastajanja superinfekcije, pojavu preosetljivosti na lek i drugih toksičnih reakcija, i to vrlo često kao posledica nepravilne primene. Rezistencija na pojedine antibiotike, kao i postojanje rezidua antibiotika u namirnicama životinjskog porekla posle neadekvatne primene i nepoštovanja karence za lekove, su pitanja koja su se u poslednjoj dekadi dvadesetog veka nametnula kao primarni problem u ovoj oblasti. Uprkos savremenom unapređenju higijene klanja i tehnike proizvodnje, kontrola (preventiva i terapija) infektivnih bolesti životinja, naročito zoonoza, neophodna je i sa aspekta bezbednosti hrane. Naime, procenjeno je da u industrijskim zemljama svake godine od bolesti koje se prenose putem hrane (namirnice animalnog porekla) oboli oko 30% ljudi, a da je 2000. godine bar 2 miliona ljudi širom sveta umrlo od dijareje (WHO, 2002a).

Kao jedna od mogućih alternativa sintetskim lekovima jeste upotreba eteričnih ulja. Odavno je primećeno da neka eterična ulja imaju antimikrobna svojstva o čemu se u prošlosti razmatralo, ali je nedavno povećanje zainteresovanosti za „zeleno” konzumiranje obnovilo interes u nauci za ove supstance. Osim antibakterijskih svojstava (Mourey i Canillac, 2002), eterična ulja ili njihovi sastojci su pokazali antivirusno (Bishop, 1995), antimikotično (Jayashree i Subramanyam, 1999, Mari i sar., 2003), antitoksično (Ultee i Smid, 2001; Juglal i sar., 2002), antiparazitsko (Pandey i sar., 2000; Pessoa i sar., 2002) i insekticidno svojstvo (Karpouhtsis et al., 1998). Smatra se da su ove karakteristike povezane sa funkcijom ovih jedinjenja u biljkama (Mahmoud i Croteau, 2002). Zbog prethodno navedenog, postavili smo zadatak da ispitamo antimikrobno dejstvo eugenola, cinamaldehida, timola i karvakrola, kao i njihovih kombinacija na *Salmonella* Enteritidis u *in vitro* uslovima.

MATERIJAL I METOD RAD

Ispitivanje osetljivosti izolovanog soja *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis iz uzoraka tkiva jetre i creva leševa živine – brojlera pred klanje poreklom sa farme iz Gospodinaca i referentnog soja *Salmonella* Enteritidis (ATSS 13076, proizvođača MicroBioLogics) na antibakterijska sredstva urađeno je primenom dilucione metode u agaru, uz određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Prilikom izvođenja ove metode od posebne je važnosti standardizacija inokuluma, a izvedena je iz kultura bakterija stare 24 sata, primenom metode spektrofotometra na talasnoj dužini od 625 nm. Posle pripreme inicijalne suspenzije bakterija gustine O.D. 0,08-0,10, finalni inokulum se pripremao razblaživanjem sa Mueller-Hinton bujonom u odnosu 1:100, radi dobijanja koncentracije od $1-2 \times 10^6$ bakterija u ml, odnosno 10^4 bakterija u 10 μ l.

Osnovni rastvori eteričnih ulja pripremani su rastvaranjem standarda, eugenola (99,8%, Eramex Aromatics GmbH, Nemačka), cinamaldehida (98,9%, Eramex Aromatics GmbH, Nemačka), timola (99,9%, Eramex Aromatics GmbH, Nemačka),

karvakrola (Essentico, Kula) i njihovih kombinacija eugenola i cinam-aldehida (2:1) i timola i karvakrola (1:1) u odgovarajućem rastvaraču – propilen glikolu. U ukupnoj količini od 10 ml osnovnog rastvora, koncentracija aktivne supstance je bila 100 µl (mg) u mililitru rastvora. Radni rastvori su pripremani neposredno pre upotrebe rastvaranjem odgovarajuće količine osnovnog rastvora u propilen glikolu. Dilucioni antibiogram je izveden tako što je napravljena serija koncentracija: 0,0195, 0,0391, 0,0781, 0,1563, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 µl/ml.

Ispitivanje osetljivosti bakterija na antimikrobna sredstva primenom dilucione metode u agaru izvedeno je u sterilnim plastičnim Petri šoljama prečnika 90 mm. U epruvete koje služe kao kontrola rasta sipano je 2 ml sterilne destilovane vode, a u ostale epruvete po 2 ml svakog razblaženja antimikrobnih sredstva, od najniže do najviše koncentracije. Zatim se u epruvete dodavalo po 18 ml rastopljenog Mueller Hinton agara (Torlak, Beograd) i nakon lagane homogenizacije se sadržaj epruveta razlivao u Petri šolje koje su prosušene u termostatu na temperaturi od 35-37°C u trajanju od 30 minuta. U podloge sa inkorporisanim antimikrobnim sredstvima inokulisano je po 10 µl prethodno standardizovane suspenzije bakterija.

Posle inkubiranja inokulisanih Mueller Hinton agara u termostatu na temperaturi od 35 do 37°C u trajanju od 18 časova, pristupilo se očitavanju rezultata.

REZULTATI I DISKUSIJA

Salmonella enterica subspecies *enterica* serotip Enteritidis je potvrđena na osnovu sledećih dijagnostičkih kriterijuma: karakterističnog izgleda kolonija na selektivno diferencijalnim podlogama, bazičnih biohemijskih parametara i pozitivnog testa aglutinacije sa poly S serumom (za sve grupe), sa grupno specifičnim serumom za grupu D₁, sa serumima za somatske antigene 9 i 12 i serumima za flagelarne antigene faza 1 (g, m).

Dobijene vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija eteričnih ulja prema ispitanim sojevima bakterija primenom dilucione metode u agaru prikazane su u tabeli br 1.

Tabela br. 1 Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) ispitivanih eteričnih ulja na izolat i referentni soj *Salmonella* Enteritidis

Aktivna supstanca	Količina aktivne supstance u podlozi µl /ml podloge									
	Kontrola	5	2,5	7,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	0,02
eugenol	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
cinam-aldehid	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
eugenol + cinamaldehyd	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
timol	+	-	.	-	-	-	-	+	+	+
	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+

karvakrol	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
timol + karvakrol	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+

* + ima porasta kolonija; – nema porasta kolonija

– rezultati za referentni soj *Salmonella* Enteritidis

Minimalna inhibitorna koncentracija eugenola, kao i kombinacije eugenola sa cinamaldehydom, iznosila je 0,625 μ l/ml. Cinamaldehyd i smeša timola i karvakrola su u manjoj koncentraciji (0,312 μ l/ml podloge) doveli do inhibicije rasta bakterija. Najbolju antibakterijsku aktivnost pokazali su timol i karvakrol čiji je MIK bio 0,156 μ l/ml. Koncentracije eteričnih ulja, napred navedene, takođe su dovele i do inhibicije rasta kolonija referentnog soja *S. Enteritidis*, što ukazuje da je osetljivost izolovanog i referentnog soja salmonele identična prema eteričnim uljima, kako pojedinačno tako i prema njihovim kombinacijama. Osetljivost izolata *Salmonella* Enteritidis u *in vitro* uslovima na ispitivane aktivne supstance eteričnih ulja, kao i njihove kombinacije, bila je očekivana, pošto ranija istraživanja ukazuju da su salmonela vrste (*Salmonella* spp.) osetljive na fenolna i aldehidna jedinjenja eteričnih ulja. *Salmonella* Enteritidis je najčešće izolovan serotip *Salmonella enterica* iz materijala poreklom od živine (Stojanov i sar., 2004).

U našim eksperimentima najbolju antibakterijsku aktivnost pokazali su timol i karvakrol čije su MIK vrednosti bile 0,156 mg/ml, odnosno μ l /ml. Do sličnih rezultata su došli Olasupo i sar. (2003) koji su takođe ispitivali MIK vrednosti eteričnih ulja prema *Salmonella* spp. Najbolju antimikrobnu aktivnost je imao timol, čije su MIK vrednosti iznosile 1,0 mmol l⁻¹, odnosno 0,1502 mg/ml, dok su MIK vrednosti za karvakrol bile 1,0 mmol l⁻¹ (0,137mg/ml) i eugenol 3,0 mmol l⁻¹ (0,492 mg/ml). Shang-Tzen i sar. (2001) ispitivali su antibakterijsku aktivnost eteričnih ulja poreklom iz listova dva klona *Cinnamomum osmophloeum* (klon A i B), koristeći agar dilucionu metodu. Koncentracije svakog testiranog sastojka, inkorporisanog u Muller – Hinton agar, bile su 100, 250, 500 i 1000 10 μ l/ml. Korišćeno je devet sojeva bakterija uključujući i *Salmonella* spp. Dobijeni rezultati ukazuju da su eterična ulja iz listova cinamona B imala bolji inhibitorni efekat, pri čemu su MIK vrednosti protiv *Salmonella* sp. bile 500 μ g/ml. U odnosu na ostale sastojke eteričnog ulja klona B, cinamaldehyd je imao najjaču antibakterijsku aktivnost (500 μ g/ml), što je u korelacija sa MIK vrednostima dobijenim u našim eksperimentima (0,312 μ l/ml).

Do sličnih rezultata su došli Nazer i sar. (2005) ispitujući inhibitorni efekat pet aktivnih supstanci eteričnih ulja (timola, karvakrola, citrala, eugenola i geraniola) i četiri organske kiseline, pojedinačno i u različitim kombinacijama protiv *Salmonella* Typhimurium. Određene su MIK vrednosti za devet antimikrobnih sastojaka, posle 72 sata inkubacije. Timol i karvakrol su imali najbolju antimikrobnu aktivnost, a njihove MIK vrednosti su bile 1,0 mmol l⁻¹, odnosno 0,150 mg/ml i 0,137 mg/ml, dok su MIK vrednosti za eugenol bile 3,2 mmol l⁻¹, odnosno 0,525 mg/ml. Ispitujući inhibitorni efekat aromatičnih supstanci u kombinacijama i koristeći kompletan

faktorijalni dizajn 2^5 (5 aromatičnih komponenti na 2 nivoa), koji omogućava procenu glavnog efekta (za svaku komponentu) i efekte međusobnih interakcija (dvojnih, trojnih, ...), isti autori su došli do zaključka da su efekti pojedinačnih komponenti u smešama predominantni u odnosu na efekte samih interakcija. Najbolju efikasnost je pokazao timol u prisustvu drugih supstanci, tako da je njegovo dodavanje u maloj količini smešama eteričnih ulja mnogo efikasnije, nego dodavanje neke druge komponente. Dobru efikasnost su pokazali i citral, karvakrol i geraniol, dok je efikasnost eugenola znatno niža, što ukazuje da je njegovo dodavanje u smeše manje korisno. Autori su zaključili da upotreba kombinacija eteričnih ulja može biti interesantna sa aspekta smanjivanja doza, ali stvarni sinergistički efekat između komponenti nije utvrđen. Takođe, rezultati ispitivanja naših kombinacija antimi-krobnih aktivnih sastojaka eteričnih ulja ukazuju da pravi antibakterijski sinergistički efekat između kombinacija dve komponente (eugenola i cinamaldehida, kao i između timola i karvakrola) nije uočen, što je u korelaciji za rezultatima istraživanja Nazera i saradnika (2005).

ZAKLJUČAK

U našim istraživanjima je urađena izolacija i identifikacija *Salmonella* Enteritidis iz materijala poreklom od živine i ispitana njena osetljivost na eugenol, cinamaldehyd, timol i karvakrol, i njihove kombinacije u uslovima *in vitro*.

Minimalna inhibitorna koncentracija – MIK (određena agar dilucionom metodom) eugenola, kao i kombinacije eugenola sa cinamaldehydom iznosila je 0,625 µl/ml. Cinamaldehyd i smeša himola i karvakrola su u manjoj koncentraciji, 0,312 µl/ml podloge, doveli do inhibicije rasta *S. Enteritidis*. Najbolju antibakterijsku aktivnost imali su timol i karvakrol, a njihov MIK je bio 0,156 mg/ml, odnosno µl/ml.

Na osnovu izvršenih ispitivanja u uslovima *in vitro*, možemo zaključiti da testirana eterična ulja delimično ili potpuno zaustavljaju razmnožavanje *S. Enteritidis*, što ukazuje da mogu imati potencijala kao eventualni antibakterijski fitofarmaci u veterinarskoj medicini.

LITERATURA

1. WHO: World health report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization, 2002.
2. Mourey A., Canillac N: Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13, 289-292, 2002.
3. Bishop C.D., Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research* 7, 641- 644, 1995.
4. Jayashree T., Subramanyam C.: Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology* 28, 179- 183, 1999.
5. Mari M., Bertolini P., Pratella, G.C.: Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 761- 766, 2003.

6. Ultee A., Smid E.J: Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 64, 373-378, 2001.
7. Juglal S., Govinden R., Odhav B.: Spice oils for the control of cooccurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of Food Protection* 65 (4), 683-687, 2002.
8. Pandey R., Kalra A., Tandon S., Mehrotra N., Singh H.N., Kumar S.: Essential oil compounds as potent source of nematocidal compounds. *Journal of Phytopathology* 148 (7-8), 501-502, 2000.
9. Pessoa L.M., Morales S.M., Bevilacqua C.M.L., Luciano J.H.S.: Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn, and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 109 (1 – 2), 59-63, 2002.
10. Karpouhtsis I., Pardali E., FeggouE., Kokkini S., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou, P.: Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1111-1115, 1998.
11. Mahmoud S.S., Croteau R.B.: Strategies for transgenic manipulation of monoterpen biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7 (8), 366-373, 2002.
12. Stojanov I., Velhner M., Orlić D: Značaj vrste uzoraka za izolaciju *Salmonella* vrsta kod živinskih materijala. U: Zbornik kratkih sadržaja / Simpozijum Veterinarstvo i stočarstvo u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, Herceg Novi, 21-25. juni, Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, 2004.
13. Olasupo N.A., Fitzgerald D.J., Gasson M.J., Narbad A.: Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Letters in Applied Microbiology*, 36, 448-451, 2003.
14. Shang-Tzen Chang, Pin-Fun Chen, Shan-Chwen Chang: Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*, *Journal of Ethnopharmacology* 77, 123-127, 2001.
15. Nazer A.I., Kobilinsky A., Tholozan J.L., Dubois-Brissonnet F.: Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv, Typhimurium: a synergistic effect?. *Food Microbiology* 22, 391-398, 2005.

Primljeno: 11. 09. 2008.

Odobreno: 21. 10. 2008.