

WPŁYW TYMOLU, EUGENOLU, ALDEHYDU CYNAMONOWEGO ORAZ MENTOLU NA ROZWÓJ BAKTERII Z RODZAJU *CRONOBACTER*

Dorota Fiedczak¹⁾, Anna Berthold-Pluta²⁾

¹⁾Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Człowieka
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii Mleka
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

obecnie jest pracownikiem Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego, Zakład Mikrobiologii
ul. Rakowiecka 36, 05-232 Warszawa

²⁾Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Człowieka
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii Mleka
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

dorota.fiedczak@ibprs.pl

Streszczenie

W badaniach określono wpływ substancji aktywnych obecnych w olejkach eterycznych na rozwój wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter*. Oceniono wrażliwość wobec tymolu, eugenolu, aldehydu cynamonowego i mentolu pięciu szczepów: *Cronobacter sakazakii* 30/2, *C. mytjensii* 20/1, *C. malonaticus* 30/4, *C. turicensis* 22/1 oraz *C. condimenti* 14/1.

Najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec badanych szczepów z rodzaju *Cronobacter* wykazał aldehyd cynamonowy, dla którego wartość MIC mieściła się w zakresie od 0,08% do 0,12%. Również eugenol wykazał dobrą aktywność przeciwbakteryjną (MIC = 0,10 - 0,14%). Tymol słabiej hamował rozwój bakterii *Cronobacter* spp. (MIC = 0,20 - 0,25%). Najślabszym działaniem przeciwbakteryjnym wobec badanych szczepów charakteryzował się mentol (MIC = 0,50 - 0,55%).

Słowa kluczowe: *Cronobacter*, tymol, eugenol, aldehyd cynamonowy, mentol

THE EFFECT OF THYMOL, EUGENOL, CINNAMALDEHYDE AND MENTHOL ON THE GROWTH OF BACTERIA OF THE GENUS *CRONOBACTER*

Summary

The work defines the influence of active substances contained in essential oils on selected *Cronobacter* strains growth. The work examines the sensitivity to thymol, eugenol,

cinnamaldehyde and menthol of 5 strains: *Cronobacter sakazakii* 30/2, *C. malonaticus* 30/4, *C. muytjensii* 20/1, *C. turicensis* 22/1 and *C. condimenti* 14/1.

It has been shown that the strongest inhibitory activity against bacteria of the genus *Cronobacter* is characterized by cinnamaldehyde. Minimal inhibitory concentration (MIC) of cinnamaldehyde was 0,08 - 0,12%, followed by eugenol (MIC = 0,10 - 0,14%). Thymol was highly effective at inhibiting *Cronobacter* spp. growth (MIC = 0,20 - 0,25%). The weakest activity against tested bacteria was noticed in the case of menthol (MIC = 0,50 - 0,55%).

Key words: *Cronobacter*, thymol, eugenol, cinnamaldehyde, menthol

WSTĘP

Wyodrębnienie rodzaju *Cronobacter* oraz jego siedmiu gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. condimenti*, *C. universalis*, *C. turicensis* i *C. dublinensis*, nastąpiło na skutek wzrostu zainteresowania tymi bakteriami, spowodowanego rosnącym wskaźnikiem śmiertelności wywoływanych przez nie zakażeń [Forsythe 2018]. Pomimo powszechności występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w środowisku naturalnym [Ueda 2017], pałeczki te mogą stwarzać istotne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Jest to spowodowane rosnącą opornością tych mikroorganizmów na antybiotyki, co znacznie utrudnia terapię zachorowań. Wyniki badań wskazujących na obecność bakterii z rodzaju *Cronobacter* w produktach spożywczych [Maćkiw i in. 2011] skłaniają środowisko naukowe do poszukiwania alternatywnych metod ograniczania rozwoju tych drobnoustrojów w żywności. Jedną z nich jest wykorzystanie olejków eterycznych oraz ich poszczególnych składników, jako naturalnych substancji konserwujących.

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* są oportunistycznymi patogenami. Są to ruchliwe, peritrichalnie urzęsione pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae* [Brenner i in. 2004]. Należą do grupy względnie beztlenowych bakterii Gram-ujemnych. Początkowo bakterie obecnie zaklasyfikowane do rodzaju *Cronobacter* określano mianem *Enterobacter cloacae*. Bazując na różnicach w sekwencji DNA, cechach biochemicznych, wrażliwości na antybiotyki oraz zdolności wytwarzania żółtego pigmentu opisano i wydzielono te drobnoustroje jako odrębny gatunek o nazwie *Enterobacter sakazakii* [Fakruddin i in. 2013, Sosnowski i in. 2014]. Na podstawie ponownie przeprowadzanych badań sekwencji genu 16S rRNA szczepów zaliczanych do gatunku *E. sakazakii* wyodrębniono sześć grup genomowych. Wówczas zaproponowano wyodrębnienie nowego rodzaju o nazwie *Cronobacter* należącego do rodziny *Enterobacteriaceae*. Klasyfikację rodzaju *Cronobacter* opublikowano w 2008 r.

(wówczas obejmował tylko pięć gatunków) [Iversen i in. 2008], a uaktualniono w 2012 r., kiedy scharakteryzowano dwa kolejne gatunki: *C. universalis* i *C. condimenti* [Joseph i in. 2012].

Pałeczki z rodzaju *Cronobacter* przeżywają w produktach spożywczych o niskiej aktywności wody oraz w szerokim zakresie temperatury. Mikroorganizmy te rozwijają się w przedziale temperatury od 6°C do 45°C. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* charakteryzują się znacznie wyższą opornością na stres osmotyczny niż inne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* [Lehner i Stephan 2004, Ghassem i in. 2011]. Iversen i in. [2004] w swoich badaniach dowiedli, że proces pasteryzacji (72°C/15 sek.) całkowicie niszczy wszystkie bakterie z rodzaju *Cronobacter*, a ich obecność w żywności może wynikać z zanieczyszczeń wtórnych produktu, które pochodzą z linii technologicznej lub zanieczyszczeń wprowadzonych do produktu wraz z dodatkami do żywności.

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* zasiedlają różnorodne środowiska naturalne. Występują nie tylko w glebie, wodzie i ściekach [Ueda 2017], ale także w szerokiej gamie surowców i produktów spożywczych. Ich obecność odnotowano w mleku, serach, mleku w proszku, mięsie, wędlinach, rybach, ryżu, herbatach, przyprawach, sałatach, kiełkach, suszonych ziołach i owocach [Berthold-Pluta i in. 2017, Garbowska i in. 2015, Iversen i Forsythe 2003, Ścieżyńska i in. 2010]. Produktem, z którego najczęściej izoluje się bakterie *Cronobacter* jest mleko w proszku, wykorzystywane do produkcji preparatów mlekozastępczych oraz żywności dla dzieci [Heperkan i in. 2017, Hochel i in. 2012]. Obecność tych mikroorganizmów w proszku mlecznym wynika z wysokiej oporności *Cronobacter* spp. na nagłe wahania temperatury oraz skrajnie niską aktywność wody w tym produkcie [Hu i in. 2018].

Grupą najbardziej narażoną na infekcje bakteriami z rodzaju *Cronobacter* są noworodki, a schorzenia przez nie wywoływane charakteryzuje szczególnie wysoki wskaźnik śmiertelności [Korpysa-Dzirba i in. 2007]. Drobnoustroje z rodzaju *Cronobacter* są odpowiedzialne za wywoływanie zagrażających życiu niemowląt przypadków posocznicy, ropnego zapalenia opon mózgowych oraz martwiczego zapalenia jelit [Sosnowski i in. 2014]. Przeważająca liczba przypadków zapalenia opon mózgowych wywołanych przez bakterie z rodzaju *Cronobacter* występowała u noworodków, a przede wszystkim u dzieci z osłabionym układem odpornościowym, niską masą urodzeniową oraz wcześniaków [Drudy i in. 2006]. Istnieją także przypadki infekcji wśród osób dorosłych - ludzi starszych oraz o obniżonej odporności immunologicznej. Opisane przypadki zachorowań nie zagrażały życiu dorosłych pacjentów i dotyczyły osób długo przebywających w szpitalach [Lai 2001, Ongradi 2002].

Z powodu obecności w genotypie szczepów z rodzaju *Cronobacter* dużej liczby genów warunkujących oporność na antybiotyki poszukuje się alternatywnych metod zwalczania zachorowań przez nie wywoływanych [Feeney i in. 2014].

Olejki eteryczne zajmują znaczące miejsce w grupie naturalnych substancji aktywnych wykazujących działanie przeciwdrobnoustrojowe. Pojęciem „olejek eteryczny” określa się lotne, zapachowe mieszaniny o konsystencji oleistej i gęstości mniejszej niż 1 g/cm³, wytwarzane przez rośliny aromatyczne jako produkty metabolizmu wtórnego [Kędzia i Hołderna-Kędzia 2012]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejków eterycznych jest uzależniona od ich składu, struktury związków aktywnych oraz rodzaju występujących w nich grup funkcyjnych. Olejki eteryczne wykazują wysoką siłę bójczą wobec grzybów oraz bakterii, przy czym charakteryzują się wyższą skutecznością w stosunku do bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych. Ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest wysoka w warunkach laboratoryjnych, ale do uzyskania takiego samego efektu poprzez zastosowanie olejku eterycznego jako dodatku do żywności wymagane jest wyższe stężenie substancji aktywnej. Olejki eteryczne jako naturalne substancje hamujące mogą wchodzić w interakcje ze składnikami żywności, a przez to zmniejsza się ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa, co jest trudne do określenia w warunkach *in vitro* [Burt 2004].

Ograniczeniem stosowania olejków eterycznych jako naturalnych konserwantów żywności jest ich nie zawsze korzystny wpływ na smak oraz zapach żywności. Zadowalające wyniki otrzymano w badaniach nad włączaniem poszczególnych składników olejków eterycznych do powłok jadalnych, a także enkapsulacją olejków eterycznych w polimerach jadalnych oraz biodegradowalnych powłokach, saszetkach i nanoemulsjach. Synergistyczne oddziaływanie olejków eterycznych z innymi czynnikami utrwalającymi pozwala obniżyć ilość dodawanego olejku, a przez to uzyskać zarówno zadowalający efekt przeciwdrobnoustrojowy, jak i ograniczyć ewentualny niekorzystny wpływ na cechy sensoryczne produktów [Tajkarimi i in. 2010, Jayasena i Cheorun 2013]. Alternatywnym przykładem wykorzystania olejków eterycznych jest produkcja opakowań aktywnych, które ograniczają wzrost mikroorganizmów w trakcie przechowywania żywności. Olejki eteryczne, jako związki lotne, w czasie przechowywania ulatniają się do wolnej przestrzeni opakowania nad produktem, przez co ograniczają rozwój mikroflory powierzchniowej. Przykładem takiego zastosowania jest wykorzystanie olejku z oregano do impregnowania celulozowych wkładów, które mogą być wykorzystywane jako podkładki w tackach do mięs [Piekarska i Kondratowicz 2010].

Celem niniejszych badań było określenie wrażliwości pięciu szczepów z rodzaju

Cronobacter: *C. sakazakii* 30/2, *C. malonaticus* 30/4, *C. muytjensii* 20/1, *C. turicensis* 22/1 oraz *C. condimenti* 14/1 na substancje aktywne wchodzące w skład olejków eterycznych. W badaniach wykorzystano następujące substancje aktywne: tymol, eugenol, aldehyd cynamonowy i mentol, będące odpowiednio głównymi składnikami olejku tymiankowego, goździkowego, cynamonowego oraz olejku z mięty pieprzowej.

Zakres pracy obejmował wyznaczenie wartości minimalnego stężenia hamującego (z ang. Minimal Inhibitory Concentration - MIC) oraz maksymalnego stężenia tolerowanego (z ang. Maximum Tolerable Concentration - MTC) dla wybranych szczepów z rodzaju *Cronobacter*. Jako MIC przyjmowano takie stężenie badanej substancji, przy której nie był widoczny wzrost wybranego szczepu z rodzaju *Cronobacter*. Natomiast jako MTC przyjęto maksymalne stężenie badanej substancji aktywnej, przy którym liczba kolonii wybranego szczepu nie różniła się jeszcze istotnie od liczby kolonii bakterii wyrosłych na płycie z pożywką bez dodatku badanej substancji aktywnej.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Ocenę wrażliwości wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter* na substancje aktywne wchodzące w skład olejków eterycznych: tymolu, mentolu, eugenolu i aldehydu cynamonowego (Sigma Aldrich) przeprowadzono w następujący sposób. Alkoholowe roztwory badanych substancji przygotowane przy użyciu 96%-owego roztworu alkoholu etylowego (POCH S.A.) dodawano w takiej ilości do uprzednio wyjałowionego, upłynnionego agaru tryptonowo-sojowego (Oxoid) znajdującego się w butelkach Schotta w ilości 50 ml, aby uzyskać określone stężenia, a następnie dokładnie mieszano. Dla eugenolu oraz aldehydu cynamonowego badano stężenia: 0,00%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,12%, 0,14%, 0,16%, 0,18%, 0,20% i 0,22%, dla tymolu: 0,00%, 0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35%, 0,40%, 0,45%, 0,50% i 0,55%, zaś dla mentolu: 0,00%, 0,25%, 0,30%, 0,35%, 0,40%, 0,45%, 0,50%, 0,55%, 0,60%, 0,65%, 0,70% i 0,75%. Przygotowaną w ten sposób pożywkę zawierającą badaną substancję aktywną rozlewano na trzy jałowe płytki Petriego, pozostawiano do zastygnięcia, a następnie obsuszano w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

Materiał badawczy stanowiło pięć szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter* z kolekcji Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Mleka SGGW, wyizolowanych z rynkowych produktów spożywczych pochodzenia roślinnego [Berthold-Pluta i in. 2017]. Namnażanie badanych szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter* przeprowadzono w agarze tryptonowo-sojowym, a następnie poddano inkubacji w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C przez

24 godziny. Po przygotowaniu serii rozcieńczeń 24-godzinnej hodowli badanego szczepu w bulionie tryptonowo-sojowym (Oxoid) 0,1 ml zawiesiny z rozcieńczenia 10^{-6} nanoszono na wcześniej przygotowane płytki Petriego z agarem tryptonowo-sojowym i badaną substancją aktywną. Posiewane rozcieńczenie hodowli badanego szczepu dobrano w ten sposób, aby liczba wyrosłych kolonii po inkubacji płytek mieściła się w zakresie od 30 do 150. Zawiesinę drobnoustrojów dokładnie rozprowadzano po powierzchni płytki za pomocą jałowej głaszczki szklanej, aż do momentu całkowitego wchłonięcia. Płytki inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Wzrost badanych bakterii był widoczny w postaci połyskujących kolonii o mleczno-żółtej barwie. Kolonie były jednolite pod względem wielkości, przyjmowały okrągły kształt oraz wyróżniały się równą linią brzegową. Po okresie inkubacji zliczano wszystkie wyrosłe kolonie. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników badań przeprowadzono w programie Statgraphics Centurion z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Porównanie istotności różnic pomiędzy średnimi liczbami wyrosłych kolonii na płytkach ze wzrostem bakterii z rodzaju *Cronobacter* odbyło się na podstawie testu Tukey'a przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli 1 przedstawiono wyznaczone wartości MTC i MIC składników olejków eterycznych dla badanych pięciu szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter*.

Tabela 1. Wartości maksymalnego stężenia tolerowanego (MTC) [%] oraz minimalnego stężenia hamującego (MIC) [%] badanych składników olejków eterycznych dla szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter*

Values of the maximum tolerable concentration (MTC) [%] and the minimum inhibitory concentration (MIC) [%] of the tested components of essential oils for Cronobacter strains

Badany szczep	Tymol		Eugenol		Aldehyd cynamonowy		Mentol	
	MTC	MIC	MTC	MIC	MTC	MIC	MTC	MIC
<i>C. sakazakii</i> 30/2	-	0,25	0,08	0,14	0,06	0,08	0,45	0,55
<i>C. malonaticus</i> 30/4	0,10	0,20	0,06	0,12	0,06	0,08	0,25	0,50
<i>C. muytjensii</i> 20/1	-	0,20	0,06	0,10	-	0,10	0,30	0,55
<i>C. turicensis</i> 22/1	-	0,20	-	0,14	-	0,12	0,30	0,50
<i>C. condimenti</i> 14/1	0,05	0,20	0,08	0,14	-	0,12	0,35	0,50

Badane szczepy bakterii wykazywały znaczną wrażliwość na główny składnik olejku tymiankowego w zakresie stężeń od 0,05% do 0,10%. Szczep *C. condimenti* 14/1 tolerował dodatek 0,05% (MTC) tymolu do pożywki stałej. Szczep *C. malonaticus* 30/4 jako jedyny rozwijał się niezachwianie do 0,10% tymolu w podłożu hodowlanym, natomiast dla szczepów *C. sakazakii* 30/2, *C. muytjensii* 20/1 oraz *C. turicensis* 22/1 nie udało się wyznaczyć MTC w badanym zakresie stężeń. Można przyjąć, że MTC dla wymienionych szczepów wynosiło poniżej 0,05% tymolu w pożywce. Największą wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) stwierdzono w przypadku szczepu *C. sakazakii* 30/2, którego wzrostu nie odnotowano dopiero przy zawartości 0,25% tymolu w pożywce. W przypadku pozostałych szczepów całkowite zahamowanie wzrostu zaobserwowano przy mniejszym stężeniu tymolu w pożywce stałej wynoszącym 0,20%.

Wrażliwość badanych szczepów, wyrażona jako MTC, na eugenol kształtowała się na poziomie od 0,06% do 0,08%. Stwierdzono, że największą wrażliwością na obecność głównego składnika olejku goździkowego w podłożu charakteryzowały się szczepy *C. malonaticus* 30/4 oraz *C. muytjensii* 20/1, które tolerowały dodatek eugenolu w stężeniu 0,06% (MTC). Większą wartość MTC (0,08%) odnotowano w przypadku szczepów *C. sakazakii* 30/2 oraz *C. condimenti* 14/1. Dla szczepu *C. turicensis* 22/1 nie udało się wyznaczyć wartości parametru MTC w badanym zakresie stężeń. Wartości MIC dla badanych szczepów mieściły się w przedziale od 0,10% do 0,14%. Pod tym względem najmniejszą wrażliwość wykazały szczepy *C. sakazakii* 30/2, *C. turicensis* 22/1 i *C. condimenti* 14/1, których wzrost został całkowicie zahamowany dopiero przy stężeniu eugenolu w pożywce hodowlanej na poziomie 0,14%. Najniższą wartość MIC dla eugenolu odnotowano dla szczepu *C. muytjensii* 20/1 (MIC = 0,10%).

Przeprowadzone badania pozwoliły ustalić wartość MTC aldehydu cynamonowego jedynie dla szczepów *C. sakazakii* 30/2 oraz *C. malonaticus* 30/4, które wynosiło 0,06%. Dla pozostałych trzech szczepów nie udało się określić wartości MTC. Zakres MIC dla przebadanych szczepów przyjmował wartości mieszczące się w przedziale od 0,08% do 0,12%. Wzrost dwóch spośród pięciu przebadanych szczepów został całkowicie zahamowany przy stężeniu 0,08% aldehydu cynamonowego w pożywce. Minimalne stężenie hamujące dla szczepu *C. muytjensii* 20/1 wynosiło 0,10%, zaś rozwój szczepów *C. turicensis* 22/1 oraz *C. condimenti* 14/1 został całkowicie zatrzymany przy dodatku 0,14% aldehydu cynamonowego do agaru tryptonowo-sojowego.

Badane szczepy bakterii charakteryzowały się niską wrażliwością na obecność mentolu w pożywce stałej. Wartość MTC mieściła się w przedziale od 0,25% do 0,45%. Szczep

C. malonaticus 30/4 tolerował obecność mentolu w agarze tryptonowo-sojowym do zawartości 0,25%, natomiast najwyższą wartość MTC, wynoszącą 0,45%, odnotowano dla szczepu *C. sakazakii* 30/2. W przypadku mentolu całkowite zahamowanie wzrostu szczepów *C. malonaticus* 30/4, *C. turicensis* 22/1 oraz *C. condimenti* 14/1 odnotowano przy stężeniu 0,50% mentolu w agarze tryptonowo-sojowym. Najmniejszą wrażliwością charakteryzowały się szczepy *C. sakazakii* 30/2 oraz *C. muytjensii* 20/1, dla których MIC osiągnęło wartość 0,55%.

Analizując otrzymane wyniki stwierdzono, że najwyższą aktywnością spośród wszystkich badanych substancji wykazał się aldehyd cynamonowy oraz eugenol. Wartości MIC dla aldehydu cynamonowego kształtowały się na najniższym poziomie, a wzrost dwóch z pięciu przebadanych szczepów został całkowicie zahamowany już przy stężeniu substancji aktywnej w pożywce stałej na poziomie 0,08%. Z kolei w przypadku eugenolu aktywność hamującą w stosunku do badanych szczepów stwierdzono od stężenia 0,10%. Nieco wyższe wartości MIC odnotowano dla tymolu. Najśłabszym czynnikiem przeciwdrobnoustrojowym wobec badanych szczepów okazał się mentol, którego MIC dla trzech spośród pięciu przebadanych szczepów wynosiło 0,50% mentolu. Jedynie w przypadku badania wpływu mentolu na rozwój szczepu *C. sakazakii* 30/2 oraz *C. muytjensii* 20/1 stwierdzono mniejszą wrażliwość od pozostałych szczepów, a wartość MIC dla tych szczepów wynosiło 0,55%.

Minimalne stężenie hamujące aldehydu cynamonowego w stosunku do przebadanych szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter* przyjęło wartości z przedziału od 0,08% do 0,12%. Otrzymany zakres jest nieco wyższy od stężeń hamujących wzrost bakterii *C. malonaticus* oraz *C. sakazakii*, który wyznaczyli Fraňková i wsp. [2014] (od 0,025% do 0,03%). Jeszcze mniejsze stężenie olejku cynamonowego hamujące wzrost szczepów *C. sakazakii* wynoszące 0,016% stwierdzili Al-Nabulsi i in. [2015]. Z kolei Lee i Jin [2008] wykazali, że kwas cynamonowy w stężeniu 0,07% hamował rozwój bakterii z rodzaju *Cronobacter*.

Aldehyd cynamonowy, jako substancja hamująca wzrost drobnoustrojów, był częstym obiektem badań naukowców. Hill i in. [2013] stwierdzili, że główny składnik olejku – aldehyd cynamonowy w stężeniu 0,04% hamował wzrost bakterii *Salmonella* Typhimurium. Działanie przeciwdrobnoustrojowe aldehydu cynamonowego przebadano również w stosunku do bakterii z gatunku *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus* [Rusenova i Parvanov 2009], a otrzymane wartości MIC wynosiły odpowiednio 0,015% i 0,03%. Podobną wrażliwość wymienionych bakterii na aldehyd cynamonowy potwierdzili także Ye i in. [2013]. W badaniach nad wrażliwością bakterii tlenowych na aldehyd cynamonowy Kędzia [2011] wyznaczył MIC na poziomie 0,05%. Natomiast Rusenova i Parvanov [2009], ale

także wcześniej Oussalah i wsp. [2007], określili MIC olejku cynamonowego wobec *Listeria monocytogenes* na poziomie od 0,05 do 0,20%.

Równie silną substancją ograniczającą wzrost badanych szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter* okazał się eugenol, który hamował ich rozwój w zakresie stężeń od 0,10% do 0,14%. Fraňková i in. [2014] stwierdzili, że wartość MIC eugenolu dla szczepów bakterii z gatunków *C. malonaticus* i *C. sakazakii* wynosiła 0,1%. Przeciwbakteryjnymi właściwościami eugenolu wobec bakterii z rodzaju *Cronobacter* zajmowali się także Lee i Jin [2008], którzy podali, że minimalne stężenie hamujące wynosiło 0,07%. Przeciwdrobnoustrojowa aktywność eugenolu często była obiektem badań także nad innymi mikroorganizmami. Eugenol wykazywał hamujące działanie wobec *Staph. aureus*, a wzrost tych drobnoustrojów był zatrzymany przy stężeniu eugenolu na poziomie 0,015% [Hołderna-Kędzia 2010]. W późniejszych badaniach Kędzi i Hołdernernej-Kędzi [2012] dotyczących przeciwdrobnoustrojowego oddziaływania pochodnych fenoli na wzrost *Staph. aureus* autorzy stwierdzili nieco wyższą wrażliwość tych bakterii (MIC = 0,03%). W badaniach dotyczących wrażliwości *S. Typhimurium* wobec eugenolu w środowisku wzrostu udowodniono, że wzrost bakterii został zahamowany przy stężeniu 0,1% [Hill i in. 2013]. Z kolei w doświadczeniach przeprowadzonych przez Olasupo i in. [2003] dla *S. Typhimurium* określono wartość MIC równą 0,05%. Filgueiras i Vanetti [2006] badali działanie eugenolu wobec *L. monocytogenes* i określili wartość MIC dla tych drobnoustrojów równą 0,1%. Eugenol wykazywał właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec *E. coli*, a wartość MIC dla tych bakterii mieściła się w szerokim zakresie stężeń od 0,04% do 0,16% [Olasupo i in. 2003, Pei i in. 2009]. Ponadto Abbaszadeh i in. [2014] udowodnili, że do grupy drobnoustrojów wrażliwych na główny składnik olejku goździkowego należą także grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* oraz *Rhizopus*. Eugenol wykazywał hamujące właściwości również w stosunku do drożdżopochodnych grzybów z rodzaju *Candida* [Kędzia i in. 2015].

W niniejszych badaniach wyznaczono wyższe wartości MIC (0,20 - 0,25%) dla tymolu, co świadczy, że jest on słabszym inhibitorem wzrostu dla wybranych szczepów z rodzaju *Cronobacter* w porównaniu z aldehydem cynamonowym i eugenolem. Wrażliwość szczepów *Cronobacter* na obecność tymolu w podłożu stałym nie była częstym obiektem badań naukowców. W literaturze dostępne są wyniki badań potwierdzające hamujące działanie tymolu na inne gatunki bakterii. Badania prowadzone przez Olasupo i in. [2003] dotyczyły wrażliwości bakterii *S. Typhimurium* oraz *E. coli* na obecność głównego składnika olejku tymiankowego w środowisku wzrostu (MIC = 0,02%). Tymol hamował rozwój *S. aureus*

i *E. coli* w zakresie stężeń od 0,01 % do 0,02 % [Kędzia i Hołderna-Kędzia 2012]. Z kolei Pei i in. [2009] wykazali, że tymol hamuje wzrost bakterii *E. coli* nawet w stężeniu 0,04%. Badacze częściej zajmowali się określaniem wpływu olejku tymiankowego na rozwój drobnoustrojów niż czystym tymolem. Rusenova i Parvanov [2009] w badaniach nad wrażliwością 14 gatunków drobnoustrojów wobec różnych olejków eterycznych wykazali, że MIC dla olejku tymiankowego było w zakresie stężeń od 0,25% do 2,00 w zależności od gatunku drobnoustrojów.

Składnikiem olejku eterycznego, dla którego stwierdzono najslabsze działanie przeciwdrobnoustrojowe był mentol. Rozwój pięciu szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter* był hamowany w wąskim zakresie stężeń od 0,50% do 0,55% mentolu w podłożu stałym (MIC). W piśmiennictwie badania z zakresu właściwości przeciwdrobnoustrojowych mentolu nie są liczne, a naukowcy częściej zajmowali się badaniem wpływu olejku mięty pieprzowej na rozwój drobnoustrojów. Rusenova i Parvanov [2009] wyznaczyli MIC dla dziewięciu olejków eterycznych, wśród których znalazł się olejek mięty pieprzowej. Najmniejszą wartość MIC stwierdzili dla *Yersinia pseudotuberculosis* (0,125%), natomiast najwyższą wartość MIC wynoszącą 0,1% - dla *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Enteritidis* oraz *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Adaszyńska i in. [2013] wykazali, że olejek mięty pieprzowej wykazywał aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec szczepów z gatunków *E. coli* oraz *Staph. aureus*. Eteghad i in. [2009] oraz Jeyakumar i in. [2011] również dowiedli, że do grupy patogenów wrażliwych na olejek mięty pieprzowej należą bakterie z gatunków *Staph. aureus*, *E. coli* i *Ps. aeruginosa*. Olejek mięty pieprzowej hamował grzyby drożdżopochodne z rodzaju *Candida* [Iscan i in. 2002].

WNIOSKI

1. Wrażliwość badanych szczepów z rodzaju *Cronobacter* na tymol, eugenol, aldehyd cynamonowy oraz mentol była cechą zależną od gatunku oraz szczepu bakterii. Szczepem najbardziej wrażliwym na badane substancje był szczep *C. malonicus* 30/4.
2. Najsilniejsze działanie hamujące wzrost badanych szczepów z rodzaju *Cronobacter* odnotowano dla aldehydu cynamonowego (MIC w zakresie od 0,08% do 0,12%) oraz eugenolu (MIC w zakresie od 0,10% do 0,14%). Najslabszą aktywnością przeciwdrobnoustrojową charakteryzował się mentol (MIC w zakresie od 0,50% do 0,55%).

PIŚMIENNICTWO

1. Abbaszadeh S., Sharifzade A., Shokr H., Khosravi A.R., Abbaszadeh, A. 2014: Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal of Medical Mycology*, 24(2), 51-56
2. Adaszyńska, M., Swarczewicz, M., Markowska-Szczupak, A., Jadczyk D. 2013: Skład chemiczny i właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku eterycznego i ekstraktu z mięty pieprzowej odmiany „Asia”. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2(87), 116-125
3. Al-Nabulsi A.A., Awaisheh S.S., Osaili T.M., Olaimat A.N., Rahahaleh R.J., Al-Dabbas F.M., Al-Kharabsheh L.A., Gyawal R., Ibrahim S.A. 2015: Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted infant milk formula by plant essential oils. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88 (1), 97-101
4. Berthold-Pluta A., Garbowska M., Stefańska I., Pluta A. 2017: Microbiological quality of selected ready-to-eat of leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology*, 65, 221-230
5. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. 2004: The Gammaproteobacteria. *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Springer, 666-668
6. Burt S. 2004: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253
7. Drudy D., Mullane N., Quinn T., Fanning S. 2006: *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 996-1002
8. Eteghad S.S., Mirzaei M., Pour S.F., Kahnamui S. 2009: Inhibitory effects of endemic *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita* essential oils on *Escherichia coli* O157:H7. *Research Journal of Biological Sciences*, 4 (3), 340-344
9. Fakruddin M., Rahaman M.M., Ahmed M.M., Hoque M.M. 2013: *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): an emerging foodborne pathogen. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 4 (6), 349-359
10. Feeney A., Kropp K.A., O'Connor R., Sleator R.D. 2014: *Cronobacter sakazakii*: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. *Gut Microbes*, 5 (6), 711-718
11. Filgueiras C.T., Vanetti M.C.D. 2006: Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (3), 405-409

12. Forsythe S.J. 2018: Updates on the *Cronobacter* genus. Annual Review of Food Science and Technology, 9, 23-44
13. Fraňková A., Marounek M., Mozrová V., Weber J., Klouček P., Lukešová D. 2014: Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. Foodborne Pathogens and Disease, 11 (10), 795-797
14. Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Róžańska L. 2015: Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. Food Microbiology, 49, 1-5
15. Ghassem M., Babji A.S., Forsythe S.J., Norrakiah A.S. 2011: Growth and survival of *Cronobacter* species as measured by media performance. International Food Research Journal, 18, 367-372
16. Heperkan D., Dalkilic-Kaya G, Juneja V.K. 2017: *Cronobacter sakazakii* in baby foods and baby food ingredients of dairy origin and microbiological profile of positive Samales. LWT – Food Science and Technology, 75, 402-407
17. Hill L.E., Gomes C., Taylor T.M. 2013: Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. LWT-Food Science and Technology, 51 (1), 86-93
18. Hochel I., Ružičková H., Krásny L., Demnerová K. 2012: Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. Journal of Applied Microbiology, 112, 1257-1265
19. Hołderna-Kędzia E. 2010: Działanie substancji olejkowych na bakterie i grzyby. Postępy Fitoterapii, 1 (11), 3-8
20. Hu S., Yu Y., Xiao X. 2018: Stress resistance, detection and disinfection of *Cronobacter* spp. in dairy products: A review. Food Control 85, 400-415
21. Iversen C., Forsythe S. 2003: Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends in Food Science and Technology, 14, 443-454
22. Iversen C., Lane M., Forsythe S.J. 2004: The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. Letters in Applied Microbiology, 38, 378-382
23. Iversen C., Mullane N., McCardell B., Tall B.D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H. 2008: *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate, the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov.,

- Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 1442-1447
24. Iscan G., Kirimer R., Kurckuoglu M., Hunsu Can Baser K., Demirci F. 2002: Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3943-3946
25. Jayasena D.D., Cheorun J. 2013: Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: a review. Trends in Food Science and Technology, 34, 96-108
26. Jeyakumar E., Lawrence R., Pal T. 2011: Comparative evaluation in the efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) oil with standards antibiotics against selected bacterial pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 253-257
27. Joseph. S., Cetinkaya E., Drahovska H., Levican A., Figueras M.J., Forsythe S.J. 2012: *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water, and food ingredients. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, 1277-1283
28. Kędzia A. 2011: Aktywność olejku cynamonowego (*Oleum Cinnamomi*) wobec bakterii beztlenowych. Postępy Fitoterapii, 1 (12), 3-8
29. Kędzia B., Hołderna-Kędzia E. 2012: Działanie przeciwdrobnoustrojowe roślinnych pochodnych fenolu. Postępy Fitoterapii, 1 (13), 151-155
30. Kędzia A., Ziółkowska-Klinkosz M., Kusiak A., Kochańska B., Kędzia A.W., Wojtaszek-Słomińska A. 2015: Działanie in vitro olejku cynamonowego (*Oleum Cinnamomi*) na grzyby drożdżopodobne. Postępy Fitoterapii, 1 (16), 16-20
31. Korpysa-Dzirba W., Rola J.G., Osek J. 2007: *Enterobacter sakazakii* - zagrożenie mikrobiologiczne żywności. Medycyna Weterynaryjna, 63 (11), 1277-1280
32. Lai K. 2001: *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. Case reports and a review of the literature. Medicine, 80, 113-122
33. Lee S.Y., Jin H.H. 2008: Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. Letters in Applied Microbiology, 47 (4), 315-321

34. Lehner A., Stephan R. 2004: Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Food Production, 67 (12), 2850-2857
35. Maćkiw E., Rzewuska K., Tomczuk K., Izak D., Stoś K. 2011: Występowanie *Cronobacter* spp. w wybranych produktach spożywczych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 4 (77), 172-178
36. Olasupo N.A., Fitzgerald D.J., Gasson M.J., Narbad A. 2003: Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Letters in Applied Microbiology, 37 (6), 448-451
37. Ongradi J 2002: Vaginal infection by *Enterobacter sakazakii*. Sexually Transmitted Infections, 78, 467
38. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2007: Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18 (5), 414-420
39. Pei R.S., Zhou F., Ji B.P., Xu J. 2009: Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. Journal of Food Science, 74 (7), 379-383
40. Piekarska J., Kondratowicz J. 2010: Substancje przeciwdrobnoustrojowe stosowane w opakowaniach do chłodzonych produktów spożywczych. Chłodnictwo, 45 (10), 40-43
41. Rusenova N., Parvanov P. 2009: Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. Trakia Journal of Sciences, 7 (1), 37-43
42. Sosnowski M., Czubkowska A., Korpysa- Dzirba W., Ostrowska M., Rola J.G., Osek J. 2014: *Cronobacter sakazakii* - charakterystyka i znaczenie w mikrobiologii żywności. Medycyna Weterynaryjna, 70 (11), 669-672
43. Ścieżyńska H., Górecka K., Grochowska A., Pawłowska K., Windyga B., Mąka Ł., Karłowski K. 2010: Ocena narażenia na *Cronobacter sakazakii* w preparatach do początkowego żywienia niemowląt w Polsce. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 3, 266-269
44. Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O. 2010: Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21, 1199-1218
45. Ueda S. 2017: Occurrence of *Cronobacter* spp. in dried foods, fresh vegetables and soil. Biocontrol Science, 22 (1), 55-59

46. Ye H., Shen S., Xu J., Lin S., Yuan Y., Jones G.S. 2013: Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control*, 34 (2), 619-623