

Instytut Żywienia Zwierząt Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie

ROBERT KRUSIŃSKI

*Wpływ olejku czosnkowego na bakterie z rodzaju Lactobacillus
w badaniach in vitro*

The Effect of Garlic Oil on *Lactobacillus* Bacteria in Tests *in vitro*

Saprofityczna flora bakteryjna przewodu pokarmowego towarzyszy organizmowi gospodarza przez całe życie, nie tylko nie czyniąc mu szkody, ale pomagając, np. w procesach trawienia, syntezy witamin. Jest ważnym elementem odporności nieswoistej, odpowiadającej za unieczynnianie związków mutagennych i rakotwórczych, bierze udział w wytwarzaniu wielu witamin, ogranicza wchłanianie cholesterolu oraz na zasadzie antybiozy uczestniczy w obronie przed drobnoustrojami patogennymi [8, 10, 12]. Należą do niej bakterie z rodzajów *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacterium*, *Enterococcus*, *Eubacterium* i grzyby rodzaju *Saccharomyces*. Ochrona przed bakteriami chorobotwórczymi, czyli działanie probiotyczne, jest jedną z ważniejszych funkcji rodzimych drobnoustrojów przewodu pokarmowego. Koncentrując się w tym zakresie na bakteriach grupy *Lactobacillus*, wyróżnić można dwojaki sposób realizowania tego celu. Wytwarzają one tzw. bakteriocyny (np. *Lactobacillus acidophilus* – laktacynę i acidofilucynę, *Lactobacillus lactis* – laktacynę, *Lactobacillus brevis* – brewicynę), wybiórczo ograniczające rozwój innych drobnoustrojów, m.in. wielu gatunków z rodzaju *Salmonella*, a także produkują takie substancje, jak kwas mlekowy czy H_2O_2 , które chronią dolne odcinki przewodu pokarmowego przed zasiedlaniem i rozwojem bakterii chorobotwórczych oraz nadmiernym namnażaniem się bakterii gnilnych. Drugi sposób działania probiotycznego polega na stymulowaniu układu immunologicznego organizmu gospodarza do produkcji przeciwciał zwalczających specyficzne patogeny [5, 6].

Prawidłowa co do składu gatunkowego i ilości mikroflora saprofityczna jest jednym z głównych warunków zdrowia zwierząt. Homeostaza mikrobiologiczna przewodu pokarmowego może zostać zakłócona w wyniku błędów żywieniowych, stresu, stanów chorobowych w obrębie układu pokarmowego oraz ubocznych efektów terapii farmakologicznej. Odbudowie i utrzymywaniu korzystnego składu mikroflory jelitowej sprzyja wprowadzenie do diety środków bakterio-bójczych dla drobnoustrojów patogennych, głównie antybiotyków paszowych, lub produktów prebiotycznych (wspomagających namnażanie bakterii saprofitycznych), takich jak oligosacharydy, zakwaszacze i zioła [7].

Szczególnie wykorzystywanie ziół jako dodatków paszowych modyfikujących mikroflorę przewodu pokarmowego wydaje się interesujące ze względu na zawartość w nich związków o działaniu antybiotykowym, nazywanych fitoncydami. Należąca do tej grupy allicyna, występująca w oleju czosnkowym, ma uznane właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne. Dosyć dokładnie poznano mechanizm działania fitoncydów zawartych w wybranych ziołach na drobnoustroje patogenne [2, 3, 4], lecz relacje te w odniesieniu do mikroflory saprofitycznej przewodu pokarmowego nadal pozostają w sferze badań doświadczalnych prowadzonych *in vitro* i *in vivo*. Ze względu na dużą różnorodność i szerokie spektrum działania metabolitów wtórnych zawartych w ziołach interesujące jest stosowanie tej grupy dodatków jako produktów prebiotycznych, w szczególności wraz z preparatami probiotycznymi [9].

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczepów bakterii kwasu mlekowego *Lactobacillus rhamnosus*. Ampułkę zawierającą co najmniej 100 mln żywych bakterii kwasu mlekowego rozpuszczono w 5 ml pożywki Eijkmana, która zawierała w 1000 cm³: pepton 10 g, NaCl 5 g, laktozę 10 g, wodę destylowaną uzupełnioną do 1000 cm³.

Bakterie inkubowano w temp. 37°C przez 24 godziny. Przygotowano 54 podłoża po 14 ml na bazie pożywki Eijkmana z dodatkiem 1% roztworu alkoholowego purpury bromokrezolowej i 2% agaru. Podłoże sterylizowano w temp. 121°C przy ciśnieniu 1 at. przez 15 minut. Do wyjałowionych podłoży dodano w ilości 0,02 ml hodowli bakterii i wymieszano w czasie jednej minuty na wyrzäsarce w celu równomiernego rozprowadzenia.

Przygotowano na bazie 100% oleju czosnkowego firmy KRKA osiem wodnych roztworów o następujących stężeniach: 50%, 36%, 19%, 11%, 6%, 3%, 1,5%, 0,75%. Emulgatorem był TRITON X-100 (t-Octylphenoxy-poly-ethoxyethanol) dodany w ilości 0,05%.

Zaszczepione podłoża umieszczono na płytkach Petriego. Na ustalone podłoża stawiano cylinderki o wymiarach 10x6 mm, wykonane ze stali nierdzewnej i kwasoodpornej (1H18N9T), które napełniono 0,3 ml danego roztworu oleju czosnkowego. Po napełnieniu cylinderków płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Po okresie inkubacji porównywano wielkość stref przebarwienia przy zastosowanych stężeniach oleju czosnkowego. Rozwój bakterii *Lactobacillus rhamnosus* w grupach oceniano pośrednio poprzez pomiar koncentrycznej strefy prze-

barwienia wokół ustawionych cylinderków zawierających czynnik doświadczalny. Wyliczono średnie pola powierzchni omawianej strefy dla sześciu powtórzeń w grupie. Zaprezentowane wyniki to procentowy udział strefy wzrostu w całkowitej powierzchni płytki Petriego. Istotność różnic między grupami wyznaczono testem t-Studenta.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W przeprowadzonym eksperymencie stwierdzono stymulujące działanie wyciągu eterowego z czosnku na wytwarzanie kwasu mlekowego oraz zaobserwowano jego związek ze stężeniem czynnika doświadczalnego. Ponieważ ilość kwasu mlekowego wytwarzanego przez bakterie grupy *Lactobacillus* jest bezpośrednio związana z tempem namnażania ich kolonii, przyjęta metoda może być traktowana jako wstępna do oznaczenia własności prebiotycznych olejku czosnkowego. Wyniki doświadczenia zostały przedstawione w tabeli:

Tab. 1. Strefa stymulacji wzrostu *Lactobacillus rhamnosus* w % pola powierzchni płytki Petriego
The zone of stimulation growth of *Lactobacillus rhamnosus* in % of the area of Petri's plate

Stężenie olejku czosnkowego %	n	% powierzchni płytki	
		x	SD
0,0	6	0,0 ^A	0,0
0,75	6	0,0 ^A	0,0
1,5	6	3,55 ^a	0,41
3,0	6	3,60 ^a	0,38
6,0	6	9,67 ^{Bb}	1,43
11,0	6	11,88 ^{Bb}	2,05
19,0	6	10,21 ^{Bb}	1,56
36,0	6	10,72 ^{Bb}	1,67
50,0	6	14,13 ^{Bb}	2,12

^{a,b}Różnice istotne przy $P \leq 0,05$ ^{A,B}Różnice istotne przy $P \leq 0,01$

Przy zastosowaniu 0,75% olejku czosnkowego nie zaobserwowano wyraźnych różnic w porównaniu z próbą kontrolną, co uniemożliwiło oznaczenie wielkości pola powierzchni. Dla obydwu tych grup przyjęto wartości 0%. Jasno-żółta barwa płytki agarowej świadczy o równomiernym rozwoju kolonii *Lactobacillus rhamnosus*. Dodatek 1,5% olejku czosnkowego spowodował widoczne przebarwienie wokół baseniku, którego pole powierzchni (wraz z polem cylinderka) wyniosło 3,55% pola powierzchni płytki. Przebarwione pole pod wpływem 3% czynnika doświadczalnego stanowiło 3,60% całej powierzchni. Inten-

sywniejszy wzrost bakterii kwasu mlekowego przy dodatku 6% ekstraktu eterowego z czosnku zaobserwowano na 9,67% powierzchni płytki. Centryczne pole powierzchni z 11% roztworem wynosiło 11,88% całości. Dodatek 19% roztworu olejku czosnkowego spowodował zwiększoną produkcję kwasu mlekowego na powierzchni 10,21% oraz odpowiednio trzydziestosześcioprocentowy roztwór dał efekt 10,72% przebarwienia, a pięćdziesięcioprocentowy – 14,13%. Wyhamowanie tempa wzrostu bakterii kwasu mlekowego przy zastosowanych wyższych stężeniach olejku czosnkowego wynikać mogło z fizycznego ograniczenia rozchodzenia się czynnika doświadczalnego w ustalonym agarze.

W opracowaniach popularnych opisujących preparaty farmakologiczne stosowane jako dodatki w żywieniu człowieka sugeruje się współdziałanie preparatów czosnkowych z bakteriami *Lactobacillus*. Przypisywane jest to jednak rozpuszczalnym w wodzie fruktooligosacharydom. Przeprowadzone doświadczenia z wykorzystaniem ekstraktu eterowego [1, 11] ukazują szerokie spektrum działania antybakteryjnego czosnku na bakterie gram-dodatnie i gram-ujemne, w tym również na mikroflorę saprofityczną przewodu pokarmowego. W świetle przeprowadzonego eksperymentu celowe wydaje się prowadzenie dalszych badań nad przedstawionym zagadnieniem przy zastosowaniu zróżnicowanych technik badań mikrobiologicznych.

WNIOSKI

Zastosowanie metody cylinderkowej w przeprowadzonych badaniach *in vitro* pozwoliło zaobserwować stymulujące działanie olejku czosnkowego na rozwój bakterii rodzaju *Lactobacillus*.

Prebiotyczne działanie olejku czosnkowego w istotny sposób nasilało się wraz ze wzrostem jego stężenia w roztworach, którymi traktowano wysiane na płytce Petriego kultury bakterii *Lactobacillus rhamnosus*.

PIŚMIENNICTWO

1. Elnima E.I., Ahmed S.A., Mekkami A.G., Mossa J.S.: The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Parmazie*, 11, 38, 747–748, 1983.
2. Góra J.: Przeciwbakteryjne działanie olejków eterycznych. *Wiad. Ziel.*, 3, 13–15, 1997.
3. Grela E., Sembratowicz I., Czech A.: Immunostymulacyjne działanie ziół. *Med. Wet.*, R.54, 3, 152–158, 1998.
4. Kędzia B.: Olejki eteryczne i preparaty olejkowe w leczeniu chorób wewnętrznych. *Wiad. Ziel.*, 1, 6–8, 2000.
5. Lutomski J.: Zdrowotne i prozdrowotne znaczenie ziół. *Zdrowa Żywność*, 2, 7–8, 2000.
6. Lutomski J.: Zioła, fitofarmaceutyki i nutraceutyki. *Postępy Fitoterapii*, 1, 4–6, 2000.

7. Łoś R., Malm A.: Zdrowe mikroby. Zastosowanie probiotyków w profilaktyce i leczeniu niektórych chorób. Alma Mater 1/46 Rok XIII ISSN 1230-0497 Styczeń – Marzec, 108–113, 2003.
8. Nurmi E., Hakkinen M., Nuotio L.: The use of probiotics for the competitive exclusion of *Salmonella* in animals, Symposium Probiotics, Berlin 1996.
9. Perdigon G., Alvarez S., Rachid M., Aquer G., Gobbato N.: Symp.: Probiotic bacteria for humans: Clinical systems for evaluation of effectiveness. Immune System Stimulation by Probiotics. J. Dairy Sci., 78, 1597, 1995.
10. Prost E.K.: Probiotyki. Med. Wet., 55, 2, 75–79, 1999.
11. Rees L.P., Minney S.F., Plummer N.T., Slater J.H., Skyrme D.A.A.: A Quantitative Assessment of the Anti-Microbial Activity of Garlic (*Allium Sativum*), World Journal of Microbiology Biotechnology, 9, 3, 3003–3007, 1993.
12. Usajewicz I.: Probiotyki w żywieniu ludzi. Med. Wet., 55, 2, 80–83, 1999.

SUMMARY

The present feed regulation and proecological life style force the producers to use healthy feed additives. Withdrawal of antibiotics from animal diets will make changes in the gut microflora. Its stabilizers are probiotics, enzymes and herbs. Many herb compounds show bacteriostatic characteristics. That is why the relationship of herbs with probiotical bacteria seems very interesting. The experiment determined the influence of garlic oil on bacteria of the type *Lactobacillus rhamnosus*. The experiment applied *in vitro* method. Strains of *Lactobacillus rhamnosus* were used to treat garlic oil in 0.75%, 1.5%, 3.0%, 6%, 11%, 19%, 36% and 50% in water solution. The area of the change of colours on Petri's plate was an indicator of the pace of *Lactobacillus rhamnosus* development. Garlic oil in high concentrations stimulated the development of *Lactobacillus rhamnosus*. The results prove dependence of increasing garlic oil concentration in ground on its stimulating effect on the studied strains from genus *Lactobacillus*.



50-

BIBLIOTEKA GŁÓWNA

Akademii Rolniczej
w Lublinie

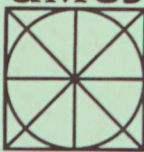
194134

M

Vol. 23

2005

UMCS



WYDAWNICTWO

WYDAWNICTWO
UNIwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej

Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5, 20-031 Lublin

POLSKA