

## WRAŻLIWOŚĆ GRZYBÓW WYZOŁOWANYCH Z MAGAZYNÓW ZAKŁADU PRZEMYSŁU SPOŻYWCZEGO NA WYBRANE OLEJKI ETERYCZNE

Łukasz Kręcidło<sup>1</sup>, Teresa Krzyśko-Łupicka<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Stypendysta w programie „Stypendia doktoranckie – inwestycja w kadre naukową województwa opolskiego” współfinansowanym przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Socjalnego, e-mail: mag18-89@o2.pl

<sup>2</sup> Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. Kardynała Bolesława Kominka 6a/6, 45-032 Opole, e-mail: teresak@uni.opole.pl

### STRESZCZENIE

Magazynowanie surowców do produkcji stanowi jeden z etapów w łańcuchu wytwarzania żywności, dlatego ważne jest zachowanie czystości mikrobiologicznej pomieszczeń magazynowych. Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu wybranych olejków eterycznych na wzrost szczepów *Trichoderma viride*, *Rhizomucor miehei*, *Penicillium janthinellum* i *Penicillium chrysogenum*, wyizolowanych z magazynu zakładu produkującego żywność. Oznaczono aktywność grzybobójczą i grzybostatyczną olejków z drzewa różanego, tymiankowego i rozmarynowego. Skład chemiczny testowanych olejków oznaczono metodą spektrometrii masowej sprzężonej z chromatografem gazowym (GC-MS). Ocenę aktywności działania olejków eterycznych przeprowadzono metodą płytkowo-krajkową w podłożu Czapek-Dox agar. Przyrost średnicy grzybni mierzono w mm, codziennie przez 10 dni. Aktywność olejków eterycznych oceniano w stosunku do kwasu nadoctowego (kontrola pozytywna) oraz jałowej wody z Tween 80 (kontrola negatywna). Najwyższą aktywnością grzybobójczą charakteryzował się olejek tymiankowy, który powodował zahamowanie wzrostu wszystkich badanych grzybów już w najniższym stężeniu ( $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ ). Najbardziej opornym na działanie testowanych olejków okazał się szczep *Penicillium janthinellum*.

**Słowa kluczowe:** grzyby strzępkowe, magazynowanie żywności, olejki eteryczne.

### SENSITIVITY OF MOLDS ISOLATED FROM WAREHOUSES OF FOOD PRODUCTION FACILITY ON SELECTED ESSENTIAL OILS

#### ABSTRACT

Storage of raw materials is one of steps in food production chain. The aim of this study was to estimate the influence of selected essential oils on the growth of four fungal strains: *Trichoderma viride*, *Rhizomucor miehei*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium janthinellum*. Strains were isolated from warehouses of the food production facility. Selected essential oils: thyme oil, rosewood oil and rosemary oil were used to assess antifungal activity. Chemical composition of essential oils was determined by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS). Antifungal activity of essential oils was estimated in relative to peracetic acid (PAA) and sterile water with Tween 80 (0,5%). The influence of essential oils on fungal growth was carried by medium poisoning method. Increment of fungal mycelium was measured every day by 10 days. The thyme essential oils totally inhibited fungal growth in the lowest concentration of  $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ . The most resistant strain was *Penicillium janthinellum*.

**Keywords:** filamentous fungi, food storage, essential oils.

#### WSTĘP

Głównym problemem przemysłu rolno-spożywczego są straty i obniżenie jakości surowców i żywności powstałe podczas ich magazynowania. Związane są przede wszystkim z nieodpowied-

nymi warunkami przechowywania i wzrostem zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Najczęstszym czynnikiem są zarodniki grzybów strzępkowych potocznie nazywanych pleśniami [Singh i wsp. 2010], które atakują zarówno świeże warzywa i owoce jak i ziarna zbóż [Arroyo-Man-

zanares i wsp. 2015], a także dodatkowo skażają je mikotoksynami. Szacuje się, że od 25 do 40% światowej produkcji zbóż jest zanieczyszczona mikotoksynami [Pereira i wsp. 2014], które są stabilne chemicznie i nie można ich usunąć w żadnym procesie przetwórczym [Vaclavikova i wsp. 2013, Hymery i wsp. 2014].

Głównym wektorem przenoszenia zarodników pleśni jest powietrze, dlatego dezynfekcja magazynów prowadzona jest w procesie fumigacji z wykorzystaniem chemicznych fungicydów w formie dymu, pary lub gazu. Jednakże częste stosowanie fungicydów prowadzi do nabywania przez grzyby oporności [Feng i wsp. 2011]. Alternatywą dla chemicznych fungicydów może być zastosowanie olejków eterycznych, które zawierają substancje lotne należące do terpenów i ich pochodnych terpenoidów. Substancje te cechują się wysoką aktywnością biologiczną oraz właściwościami antymikrobiologicznymi [Kumar i wsp. 2007; Feng i wsp. 2011; Białoń i wsp. 2014]. Olejki powodują zahamowanie wzrostu grzybni oraz przeciwdziałają wydzielaniu przez grzyby mikotoksyn [Gameda i wsp. 2014; Kohiyama i wsp. 2015]. Natomiast duża zawartość substancji lotnych umożliwia wykorzystanie olejków w procesie fumigacji magazynów [Prakash i wsp. 2015].

## MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy stanowiły cztery dominujące szczepy grzybów wyizolowane z powietrza w magazynach przemysłu rolno-spożywczego zlokalizowanych na Opolszczyźnie. Należały one do gatunków: *Trichoderma viride*, *Rhizomucor miehei*, *Penicillium janthinellum* i *Penicillium chrysogenum*. W badaniach wykorzystano inokulum w formie krążków pożywki o średnicy 10 mm przerośniętej grzybnią. Otrzymywano je prowadząc hodowle testowanych szczepów metodą zalewową w podłożu Czapek Dox Agar (CYA). W tym celu upłynnioną pożywkę CYA inokulowano wystandaryzowaną zawiesiną o gęstości  $1 \cdot 10^7$  jtk  $\cdot$  cm<sup>-3</sup> i inkubowano w temperaturze 25°C przez 10 dni, a następnie korkoborem wycinano krążki.

Testowane olejki eteryczne dostępne w obrocie handlowym w Polsce takie, jak tymiankowy, z drzewa różanego i rozmarynowy wprowadzono do podłoża w stężeniach: 1; 5; 10; 15 i 20 mm<sup>3</sup>·cm<sup>-3</sup>. Skład chemiczny olejków oznaczono metodą

spektrometrii masowej sprzężonej z chromatografem gazowym (GC-MS) [Białoń i wsp. 2014].

Aktywność fungistatyczną olejków eterycznych oceniono metodą krążkowo-płytkową opisaną przez Solimana i Badeaa [2002] oraz Fenga [2011]. Na powierzchnię zmodyfikowanej odpowiednimi stężeniami olejków pożywki CYA wykładano inokulum. Próby inkubowano w temperaturze 25 °C przez 10 dni i codziennie mierzone średnicę wzrostu kolonii grzybów. Kontrolę pozytywną stanowiło podłoże CYA zawierające kwas nadoctowy w stężeniu: 3 mm<sup>3</sup>·cm<sup>-3</sup>, który jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych substancji dezynfekcyjnych stosowanych w przemyśle spożywczym.

Kontrolę negatywną stanowiło niezmodyfikowane podłoże CYA (bez olejków) z wyłożonym krążkiem. Analizę wykonano w 4 powtórzeniach

Aktywność fungistatyczną testowanych olejków oceniano na podstawie procentu zahamowania wzrostu kolonii grzybów obliczonego ze wzoru Abbotta [Borecki 1984]:

$$I = \frac{K - A}{K} 100$$

gdzie:  $I$  – współczynnik zahamowania - stymulacji wzrostu,

$K$  – średnica kolonii grzyba na płycie kontrolnej,

$A$  – średnica kolonii grzyba na płycie z danym olejkiem.

Indeks tempa wzrostu liniowego grzybni ( $T$ ) wyznaczono na podstawie pomiarów przyrostu kolonii grzybów posługując się wzorem [Gleń i Boligłowa 2011]:

$$T = \frac{A}{D} + \frac{b_1}{d_1} + \frac{b_x}{d_x}$$

gdzie:  $T$  – indeks tempa wzrostu liniowego,

$A$  – średnia z pomiarów średnicy kolonii [mm],

$D$  – czas trwania doświadczenia,

$b_1 \dots b_x$  – przyrost średnicy kolonii [mm],

$d_1 \dots d_x$  – liczba dni od ostatniego pomiaru.

Równolegle wyznaczono minimalne stężenie olejku hamujące wzrost grzybni (MIC – Minimum Inhibitory Concentration) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC – Minimum Fungicidal Concentration). MIC to najniższe stężenie olejku powodujące 99–100% zahamowanie wzrostu grzybni, w porównaniu do kontroli negatywnej. MFC to zawartość substancji aktywnych w roz-

tworze powodująca zabicie komórek wegetatywnych i zarodników grzybów tzn najniższe stężenie olejku, które powoduje trwałe (100%) zahamowanie wzrostu grzybni. Oceniono je poprzez transfer krążka z grzybnią z podłoża modyfikowanego olejkami na podłoże podstawowe CYA (bez olejków). Płytki z przeniesionym krążkiem inkubowano w 25 °C przez 10 dni. Brak rozwoju grzybni (trwałe zahamowanie wzrostu), uznano za aktywność grzybobójczą olejku [Kumar i wsp. 2007].

## WYNIKI

Rozwój testowanych grzybów był zróżnicowany i zależał zarówno od rodzaju, jak i zasto-

sowanego stężenia użytych olejków eterycznych. O aktywności biologicznej i skuteczności działania olejków decyduje skład jakościowy i ilościowy. Na podstawie analizy GC-MS stwierdzono, że badane olejki zawierały związki terpenowe. Zawartość monoterpenu alifatycznego, mono-, bi-, tricyklicznego oraz seskwiterpenów zamieszczono w tabeli 1, a ich tlenowych pochodnych w tabeli 2. Olejek z drzewa różanego posiadał w swoim składzie jedynie tlenowe pochodne terpenów, a w największych ilościach występował linalol (80%). Olejek tymiarkowy charakteryzował się wysoką zawartością związków fenolowych, a dominującą substancją był tymol stanowiący prawie 46% olejku. Natomiast olejek rozmarynowy, w przeciwieństwie do dwóch pozostałych, zawierał wysokie stężenie monoterpenu bi- i tri-

**Tabela 1.** Zawartość mono- i seskwiterpenów w badanych olejkach eterycznych [%]

**Table 1.** Content of mono- and sesquiterpens in the essential oils [%]

Związki chemiczne	Olejki		
	z drzewa różanego	tymiarkowy	rozmarynowy
Alifatyczne monoterypeny			
β-mircen	0	2,44	1,69
Monocykliczne monoterypeny			
Limonen	0	15,15	0
α-terpinen	0	2,32	0,05
γ-terpinen	0	8,10	2,18
Terpinolen	0	0,00	0,70
α-felandren	0	0,87	0,11
Suma	0	28,88	4,73
Bi i tricykliczne monoterypeny			
α-pinen	0	2,75	10,31
β-pinen	0	0,65	7,72
Kamfen	0	1,93	8,22
α-tujon	0	0,00	3,71
α-kubenen	0	0,00	0,15
β-kubenen	0	0,00	0,14
α-longipinen	0	0,00	0,07
Ylangen	0	0,00	0,13
Kopaen	0	0,00	0,58
Longifolen	0	0,00	0,56
(+)-aromadendren	0	0,00	0,09
γ-kandien	0	0,00	0,31
δ-kandien	0	0,00	0,38
γ-murolen	0	0,00	0,11
Tricyklen	0	0,17	0,47
Suma	0	5,50	32,97
Seskwiterpeny			
α-kariofilen	0	4,71	9,01
Izokariofilen	0	0,00	0,04
Suma	0	4,71	9,05

**Tabela 2.** Zawartość tlenowych pochodnych mono- i seskwiterpenów w olejkach eterycznych [%]**Table 2.** Content of oxygenated derivatives of mono- and sesquiterpens in the essential oils [%]

Związki chemiczne	Olejki		
	z drzewa różanego	tymiankowy	rozmarynowy
Tlenowe pochodne monoterpenów			
Linalol	80,42	8,90	1,83
Tlenek cis-linalolu	4,51	0	0
Tlenek trans-linalolu	1,15	0	0
Dihydrolinalool	1,20	0	0
Propionian linalolu	4,07	0	0
Eukaliptol	7,42	15,15	15,75
Tymol	0	45,75	0
Kamfora	0	0	16,13
Bergamol	0	0,93	0
Borneol	0	3,00	7,99
Octan borneolu	0	0	3,46
Fenchol	0	0	0,08
Octan fenchylu	0	0	0,54
$\alpha$ -terpineol	1,23	2,33	5,64
1-terpinen-4-ol	0	0	1,40
Suma	100,00	76,06	51
Tlenowe pochodne seskwiterpenów			
Tlenek kariofilenu	0	0	0,28
Suma	0	0	0,28

cyklicznych (ok. 33%), a głównymi składnikami były: kamfora – 16%, eukaliptol – 16%,  $\alpha$ -pinen – 10 %, kamfen i borneol – 8%.

Aktywność fungistatyczna testowanych olejków zależała zarówno od rodzaju olejku jak i wrażliwości testowanych grzybów (tab. 3). Najskuteczniej (w 100%) wzrost wszystkich gatunków grzybów w stężeniu  $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$  zahamował olejek tymiankowy. Natomiast olejek z drzewa różanego całkowicie zahamował wzrost *Penicillium chrysogenum* w stężeniu  $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ , szczepów *Trichoderma viride* i *Rhizomucor miehei* w stężeniu  $5 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ , a *Penicillium janthinellum* –  $10 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ .

Bardziej zróżnicowane właściwości grzybostatyczne wykazał olejek rozmarynowy, który zahamował wzrost grzybni *Trichoderma viride* i *Rhizomucor miehei* jedynie w najwyższych badanych stężeniach ( $15$  i  $20 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ ). Natomiast na rozwój grzybni *Penicillium janthinellum* działał podobnie jak olejek z drzewa różanego. W przypadku *Penicillium chrysogenum* nie zahamował wzrostu grzybni w 100% jedynie w najniższym stężeniu. Kwas nadoctowy w stężeniu  $3 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$  nie spowodował zahamowania wzrostu żadnego z testowanych szczepów, co wskazuje na niską skuteczność niszczenia grzybów magazykowych.

Wszystkie testowane olejki w porównaniu do kontroli względnej, w badanych stężeniach zmniejszały tempo wzrostu grzybni. Indeks tempa wzrostu *T. viride* i *R. miehei* w obecności olejku z drzewa różanego w stężeniu  $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$  obniżał się o połowę (z 88 do ok. 46 mm na dzień). Olejek rozmarynowy mimo, że wykazywał niski współczynnik zahamowania wzrostu to spowalniał rozwój wszystkich testowanych szczepów w stężeniach powyżej  $5 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ . Natomiast kwas nadoctowy nie spowodował wyraźnych zmian w tempie przyrostu grzybni (tab. 4).

W celu oceny skuteczności działania olejków, jako potencjalnych preparatów dezynfekcyjnych wyznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost grzybni (MIC) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC). Wartości te ustala się przy badaniu właściwości antymikrobiologicznych olejków eterycznych oraz leków i antybiotyków. Najniższe wartości MIC jak i MFC testowanych szczepów wyznaczone dla olejku tymiankowego wynosiły  $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$  (rys. 1a). MIC dla olejku z drzewa różanego zależał od wrażliwości szczepu. Najbardziej wrażliwy na substancje czynne tego olejku był szczep *P. janthinellum* (MIC =  $5 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ ). MFC dla *R. miehei* i *T. viride* wynosiło  $15 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ , natomiast dla *P. chrysogenum*

**Tabela 3.** Aktywność fungistatyczna testowanych olejków eterycznych wyrażona w procentach jako współczynnik zahamowania wzrostu [%±SD]**Table 3.** Fungistatic activity of tested essential oils worded in percentage as rate of growth inhibition [%±SD]

Stężenie preparatu [mm <sup>3</sup> ·cm <sup>-3</sup> ]	Współczynnik zahamowania tempa wzrostu (I)			
	Zastosowane preparaty			
	kwask nadcoctowy	olejek tymiankowy	olejek z drzewa różanego	olejek rozmarynowy
<i>Trichoderma viride</i>				
1	–	100,00 ± 0,00	48,33 ± 8,00	0,00 ± 0,00
3	0,00 ± 0,00	–	–	–
5	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	39,79 ± 10,00
10	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	98,13 ± 0,00
15	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
20	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
<i>Rhizomucor miehei</i>				
1	–	100,00 ± 0,00	47,50 ± 6,14	0,00 ± 0,00
3	0,00 ± 0,00	–	–	–
5	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	64,06 ± 2,64
10	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	86,41 ± 3,48
15	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100 ± 0,00
20	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100 ± 0,00
<i>Penicillium janthinellum</i>				
1	–	100,00 ± 0,00	56,97 ± 3,84	21,21 ± 6,08
3	15 ± 8,16	–	–	–
5	–	100,00 ± 0,00	92,73 ± 8,91	58,64 ± 9,03
10	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
15	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
20	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
<i>Penicillium chrysogenum</i>				
1	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	61,66 ± 7,80
3	0,00 ± 0,00	–	–	–
5	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
10	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
15	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
20	–	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00

10 mm<sup>3</sup>·cm<sup>-3</sup> (rys. 1b). W przypadku olejku rozmarynowego MIC dla poszczególnych szczepów wynosił od 5 mm<sup>3</sup>·cm<sup>-3</sup> dla *P. chrysogenum* do 15 mm<sup>3</sup>·cm<sup>-3</sup> dla *R. mehei* i *T. viride*. Ponieważ olejek ten w stężeniach stosowanych w doświadczeniu nie wykazał właściwości grzybobójczych, dlatego nie ustalono MFC (rys. 1c).

## DYSKUSJA

W przetwórstwie rolno-spożywczym istnieje duże zapotrzebowanie na bezpieczne preparaty dezynfekcyjne. W związku z narastającą opornością mikroorganizmów na związki chemiczne dla uzyskania jałowości środowiska produkcji poszukuje się nowych rozwiązań. Dużym zain-

teresowaniem ze względu na działanie grzybobójcze cieszą się olejki eteryczne. Głównym celem zastosowania ich w przechowywalnictwie jest wyeliminowanie grzybów potencjalnie toksynotwórczych i zahamowanie produkcji mikotoksyn. Badania obejmują głównie szczepy *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. parasiticus*) i *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. notatum*, *P. italicum*, *P. digitatum*) [Bluma i Etcheverry 2008; Passone i wsp. 2013], ale w tym środowisku rozpowszechnione są także grzyby rodzajów *Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*.

Biobójcze działanie olejków jest uzależnione od ich składu chemicznego i stężenia oraz od wrażliwości szczepów grzybów [Krzyśko-Łupicka i Walkowiak 2014]. Testowane olejki tymian-

**Tabela 4.** Indeks tempa wzrostu testowanych szczepów grzybów. Wartość indeksu obliczono dla stężeń olejków przy, których nie uzyskano 100 % zahamowania wzrostu grzybni [ $\text{mm} \cdot \text{dzień}^{-1}$ ]

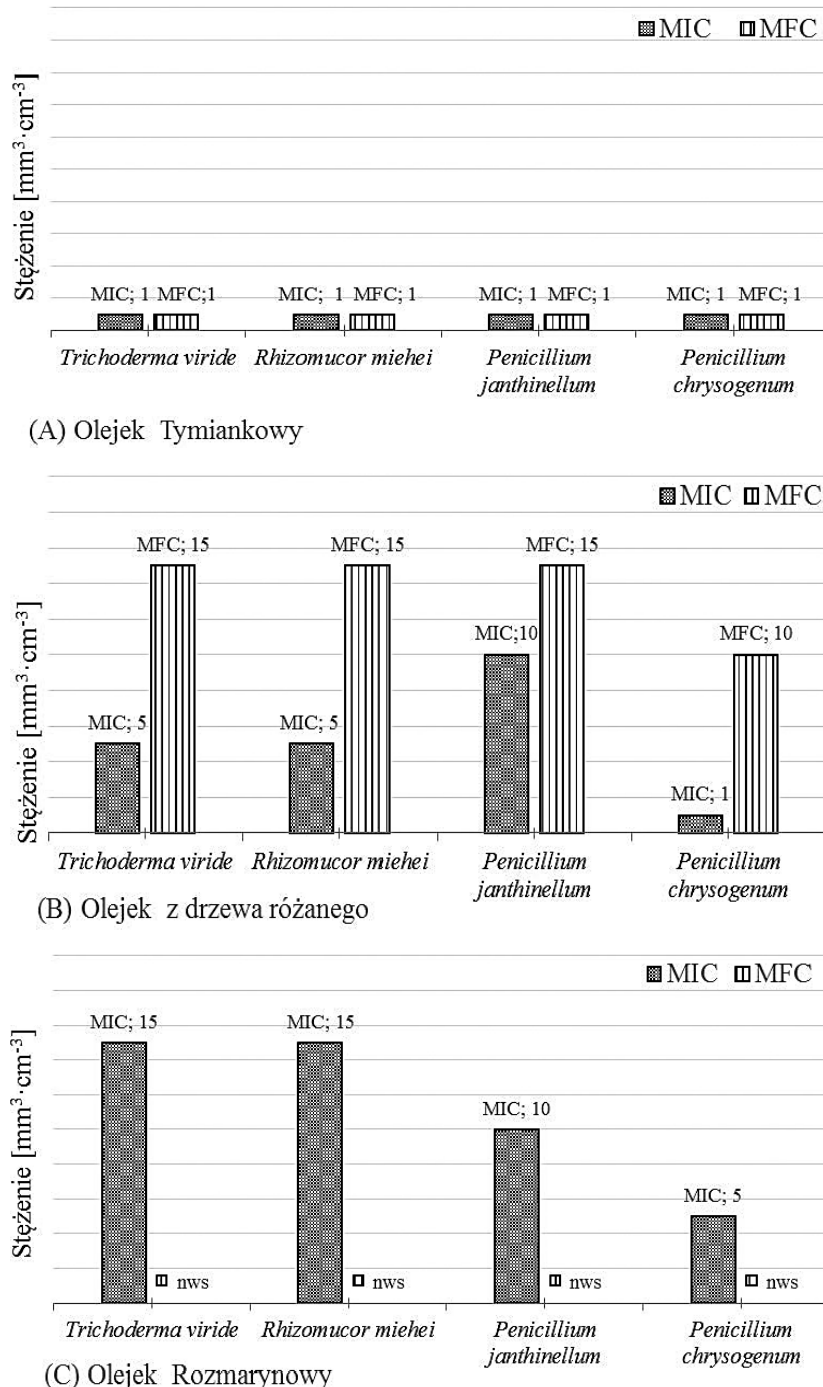
**Table 4.** Index of growth rate for tested fungi. Values were estimated only for these concentration of essential oils which did not inhibit growth of mycelium [ $\text{mm} \cdot \text{day}^{-1}$ ]

Stężenie preparatu [ $\text{mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ ]	Indeks tempa wzrostu (T)			
	Kontrola negatywna	Zastosowane preparaty		
		kwask nadocetowy	olejek z drzewa różanego	olejek rozmarynowy
	<i>Trichoderma viride</i>			
	88,00 ± 0,00	–	–	–
1	–	–	45,47 ± 3,00	88,00 ± 0,00
3	–	88,00 ± 0,00	–	–
5	–	–	–	52,98 ± 8,94
10	–	–	–	1,65 ± 0,00
	<i>Rhizomucor miehei</i>			
	88,00 ± 0,00	–	–	–
1	–	–	45,47 ± 5,40	88,00 ± 0,00
3	–	88,00 ± 0,00	–	–
5	–	–	–	31,63 ± 3,56
10	–	–	–	11,97 ± 3,10
	<i>Penicillium janthinellum</i>			
	30,25 ± 1,87	–	–	–
1	–	–	13,02 ± 3,14	22,28 ± 1,48
3	–	25,85 ± 3,06	–	–
5	–	–	2,20 ± 2,83	12,51 ± 5,16
	<i>Penicillium chrysogenum</i>			
	32,04 ± 2,73	–	–	–
1	–	–	–	12,28 ± 2,50
3	–	32,04 ± 2,73	–	–

kowy i z drzewa różanego efektywniej hamowały wzrost grzybni niż olejek rozmarynowy. Wysoka aktywność aseptyczna olejku tymiankowego jest związana z wysoką zawartością związków fenolowych (zwłaszcza tymolu) [Kędzia 2006, Abbaszadeh i wsp. 2014, Campos-Requena i wsp. 2015]. Tymol jest głównym składnikiem olejku tymiankowego, ale występuje również w mniejszych stężeniach w olejkach lebiodkowym, rozmarynowym i bazyliowym. Jednak analiza GC-MS wykazała, że w testowanym olejku rozmarynowym nie było tymolu. Jest to możliwe, ponieważ zawartość poszczególnych substancji aktywnych w olejkach eterycznych zależy od jakości surowca, warunków jego uprawy oraz przechowywania [Szumny i wsp. 2010; Jiang i wsp. 2011]. Zarówno olejek tymiankowy jak i z drzewa różanego w swoim składzie miały wysoką zawartość tlenowych pochodnych monoterpenu, co wskazuje na wysoką aktywność antimikrobiologiczną tych związków [Espina i wsp. 2011; Białoń i wsp. 2014]. Z kolei olejek rozma-

rynowy charakteryzował się wysokim stężeniem monoterpenu bi- i tricyklicznego (32,98%) w porównaniu do olejków różanego (0,00%) i tymiankowego (5,50%). Związki te jednak wydają się być mniej aktywne antimikrobiologiczne niż np. ich utlenione pochodne [Hyldgaard i wsp. 2012]. Przykładem może być  $\alpha$ -pinen, który w mniejszym stopniu hamował wzrost *C. albicans* niż jego pochodna  $\alpha$ -pinonen [Dhar i wsp. 2004].

Głównym składnikiem olejku z drzewa różanego był linalol, stanowił on aż 80,42% zawartości olejku. Istnieją doniesienia zarówno o wysokich właściwościach grzybobójczych linalolu w stosunku np. do *P. italicum* [Shimada i wsp. 2014], jak i o niewielkim zahamowaniu innych szczepów *Penicillium ssp.*, a także *Aspergillus ssp.*, *Fusarium ssp.* [Yaouba i wsp. 2010]. Związane to może być ze zdolnością niektórych grzybów strzępkowych do biotransformacji linalolu do innych substancji aromatycznych [Molina i wsp. 2013] albo innych terpenów i ich pochodnych właśnie do linalolu [Demyttenaere i wsp. 2000].



**Rys. 1.** Minimalne stężenie hamujące wzrost grzybów (MIC) oraz minimalne stężenie grzybobójcze dla olejków: tymiankowego (A), z drzewa różanego (B), rozmarynowego (C). \*nws – nie wyznaczono stężenia  
**Fig. 1.** Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration for essential oils: thyme (A), rosewood essential (B) rosemary (C). \*nws-concentration was not estimated

Wzrasta znaczenie badań nad fazą lotną olejków eterycznych. Zastosowany do fumigacji olejek tymiankowy skutecznie hamuje wzrost *Alternaria alternata* na pomidorach cherry [Feng i wsp. 2011] natomiast mieszanka olejków cytrusowych w fazie lotnej – *P. chrysogenum*, *A. niger* i *A. alternata* zarówno w testach in vitro jak i testach prowadzonych na żywności.

Głównymi problemami związanymi z ich zastosowaniem są [Wattanasatcha i wsp. 2012, Białoń i wsp. 2014]:

- brak danych o pełnej toksyczności olejku pochodzącego z danej rośliny (ze względu na fakt, że olejki są mieszaniną wielu substancji aktywnych biologicznie),
- zmiany w składzie olejku w zależności od doj-

rzałości, warunków wzrostu czy też jakości surowca z którego pochodzi olejek

- krótki okres działania substancji aktywnych w olejku (ze względu na ich lotny charakter),
- ograniczona rozpuszczalność w wodzie terpenów i ich pochodnych zawartych w olejkach eterycznych

Zastosowanie olejków eterycznych jako naturalnych konserwantów, czy środków grzybobójczych w procesie magazynowania żywności wymaga dalszych badań. Następnym etapem będzie ocena wpływu fazy lotnej olejków na zahamowania wzrostu grzybów magazynowych.

## WNIOSKI

1. Najwyższą aktywność grzybobójczą wykazał olejek tymiankowy, który już w najniższym stężeniu ( $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ ), zahamował wzrost wszystkich badanych grzybów, co najprawdopodobniej związane jest z wysoką zawartością tymolu (ponad 40%).
2. Olejki o wysokiej zawartości monoterpenoidów (tymiankowy i z drzewa różanego) charakteryzowały się wyższą aktywnością grzybobójczą niż olejek o wysokiej zawartości monoterpenów (rozmarynowy).
3. Najbardziej opornym na działanie testowanych olejków był szczep *Penicillium janthinellum*.

## LITERATURA

1. Abbaszadeh S., Sharifzadeh A., Shokri 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 de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* 24(2), 51.
2. Arroyo-Manzanares N.; Huertas-Pérez J.F.; Gámiz-Gracia L.; García-Campaña A.M. 2015. Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups. *Food Chemistry* 177, 274–279.
3. Białoń M., Krzyśko-Łupicka T., Koszałkowska M., Wieczorek P. 2014. The Influence of Chemical Composition of Commercial Lemon Essential Oils on the Growth of *Candida* Strains. *Mycopathologia* 177, (1-2), 29–39.
4. Bluma R.V., Etcheverry A., Miriam G. 2008. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology* 25(2), 324–334.

5. Borecki Z. 1984. Fungicydy stosowane w Ochronie Roślin. PWN, Warszawa.
6. Campos-Requena V.H., Rivas B.L., Pérez M.A., Figueroa C.R., Sanfuentes E.A. 2015. The synergistic antimicrobial effect of carvacrol and thymol in clay/polymer nanocomposite films over strawberry gray mold. *LWT - Food Science and Technology* 64(1), 390–396.
7. Demyttenaere J.C., del Carmen H.M., Kimpe N. 2000. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochemistry* 55(4), 363–373.
8. Dhar P., Ayala U., Andarge E., Morisseau S., Snyder-Leiby T. 2004. Study of the Structural Changes on the Antimicrobial Activity of [3.1.1.]-Bicyclics. *Journal of Essential Oil Research* 16(6), 612–616.
9. Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., García D., Pagán R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control* 22(6), 896–902.
10. Feng W., Chen J., Zheng X., Liu Q. 2011. Thyme oil to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo* as fumigant and contact treatments. *Food Control* 22(1), 78–81.
11. Gameda N., Woldeamanuel Y., Asrat D., Debelala A. 2014. Effect of essential oils on *Aspergillus* spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4, 373.
12. Gleń K.; Boligłowa E. 2011.. The effect of PRP Sol fertilizer on the dynamics of phytopathogenic and antagonistic fungi growth *in vitro*. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 56(3), 98–103.
13. Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R. L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3, 12.
14. Hymery N., Vasseur V., Coton M., Mounier J., Jany J-L., Barbier G., Coton, E. 2014. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4), 437–456.
15. Jiang Y., Wu N., Fu Y-J., Wang W., Luo M., Zhao C-J. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32(1), 63–68.
16. Kędzia A. 2006. Evaluation of the susceptibility anaerobic bacteria to thyme oil. *Postępy Fitoterapii*, 131–135.
17. Kohiyama C.Y., Yamamoto R.M.M., Mossini S.A.G., Bando E., Bomfim N.S., Nerilo S.B. 2015. Antifungal properties and inhibitory effects upon af-



- latoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. Food Chemistry 173, 1006–1010.
18. Krzyśko-Łupicka T., Walkowiak W. 2014. Evaluation of susceptibility of phytopathogenic *Fusarium culmorum* strain on selected essential oils. Ecol. Chem. Eng. A, 21(3), 355–366.
  19. Kumar R., Dubey N.K., Tiwari O.P., Tripathi Y.B., Sinha Kauskal K. 2007. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored food commodities from fungal infestation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 87(9), 1737–1742.
  20. Molina G., Pinheiro D.M., Pimentel dos Ssanros R., Pastore G.M. 2013. Monoterpene bioconversion for the production of aroma compounds by fungi isolated from Brazilian fruits, dostępne na stronie internetowej: <http://unicamp.sibi.usp.br/handle/SBURI/57869>,
  21. Passone M.A., Girardi N.S., Etcheverry M. 2013. Antifungal and antiaflatoxic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. LWT – Food Science and Technology 53(2), 434–444.
  22. Pereira V.L., Fernandes J.O., Cunha S.C. 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. Trends in Food Science Technology 36(2), 96–136.
  23. Prakash B., Kedia A., Mishra P.K., Dubey N.K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. Food Control 47, 381–391.
  24. Shimada T., Endo T., Fujii H., Rodríguez A., Peña L., Omura M. 2014. Characterization of three linalool synthase genes from Citrus unshiu Marc. and analysis of linalool-mediated resistance against *Xanthomonas citri subsp. citri* and *Penicillium italicum* in citrus leaves and fruits. Plant science: an international journal of experimental plant biology 229, 54–166.
  25. Singh P., Shukla R., Prakash B., Kumar A., Singh S., Mishra P.K., Dubey Nawal K. 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. Food and Chemical Toxicology 48(6), 1734–1740.
  26. Soliman K.M., Badeaa R.I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and Chemical Toxicology 40(11), 1669–1675.
  27. Szumny A., Figiel A., Gutiérrez-Ortiz A., Carbonell-Barrachina Á. A. 2010. Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. Journal of Food Engineering 97(2), 253–260.
  28. Vaclavikova M., Malachova A., Veprikova Z., Dzuman Z., Zachariasova M., Hajslova J. 2013. ‘Emerging’ mycotoxins in cereals processing chains: changes of enniatins during beer and bread making. Food Chemistry 136(2), 750–757.
  29. Wattanasatcha A., Rengpipat S., Wanichwecharungruang S. 2012. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. International Journal of Pharmaceutics 434 (1-2), 360–365.
  30. Yaouba A, Tatsadjieu N.L., Michel D.P.M., Etoa F.X. 2010. Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. Journal of Yeast and Fungal Research 1(1), 01–08.