

Badanie aktywności antybiotycznej krajowego olejku konopnego

¹Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Grzegorz Spychalski

²Szpital Wojewódzki w Poznaniu

Dyrektor Szpitala Wojewódzkiego: dr Jacek Łukomski

INVESTIGATION ON ANTIBIOTIC ACTIVITY OF NATIVE HEMP ESSENTIAL OIL

SUMMARY

To the investigations were used hemp essentials oil obtained from native cultivar of hemp (*Cannabis sativa* L.). The main components of essential oil were: β -myrcene (40.3%), ocimene oxide (16.3%), trans-caryophyllene (12.8%), α -pinene (9.5%) and limonene. The investigations included 61 strains of microorganism: 6 Gram-positive bacteria, 7 Gram-negative bacteria, 16 yeasts, 29 dermatophytes and 3 moulds. The estimation of antibiotic activity was conducted on fluid media: Antibiotic Broth (bacteria), Sabouard Broth (fungi) by methods of serial dilutions. The minimal concentration of hemp essential oil (mg/ml) inhibiting the growth of investigated strains (MIC – Minimal Inhibitory Concentration) was estimated. Then were the results counted into antibiotic units (AU). The high antibiotic activity showed the hemp essential oil against Gram-positive bacteria (averagely 1000 AU), yeasts (averagely 4500 AU) and dermatophytes (averagely 1100 AU). The tested essential oil acted mild against Gram-negative bacteria (averagely 95 AU) and moulds (averagely 245 AU). On the base of conducted studies could be resulted the use of native hemp essential oil as a component of dermatologic and cosmetics preparations.

KEY WORDS: HEMP ESSENTIAL OIL – ANTIBIOTIC
ACTIVITY – PATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI
– DERMATOLOGY

Wprowadzenie

Konopie siewne (*Cannabis sativa* L.) o niskiej zawartości kanabinonów, w tym Δ^9 -tetrahydrokanabinoidu (Δ^9 -THC) poniżej 0,2% w suchej masie ziela, od dawna wykorzystywane są do celów przemysłowych. Roślina ta jest uprawiana na świecie i w Polsce przede wszystkim ze względu na włókna celulozowe, które wykorzystuje się w przemyśle tekstylnym oraz do produkcji wyrobów pozawłókienniczych stosowanych w budownictwie, motoryzacji, przemyśle kompozytowym i celulozowo-papierniczym (1, 2).

W związku ze wzrostem uprawy tej rośliny w Polsce, pojawił się problem zagospodarowania wierzchołków konopnych, które dotychczas przeznaczone były na cele opałowe lub traktowane jako bezużyteczny odpad. Od 2002 r.

w Instytucie Włókien Naturalnych (obecnie Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich) prowadzone były prace nad możliwością oddzielnego zbioru wierzchołków konopnych z przeznaczeniem ich do produkcji olejku eterycznego konopnego na drodze destylacji z parą wodną (3, 4). Ze względu na swoisty aromat olejek ten jest wykorzystywany do produkcji kosmetyków, żywności, środków ochrony roślin i w aromaterapii.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności antybiotycznej eterycznego olejku konopnego w kontekście możliwości wykorzystania tego produktu do celów leczniczych.

Materiały i metody

Olejek konopny

W badaniach użyto eterycznego olejku konopnego (olejku konopnego) otrzymanego z ziela konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.). Do tego celu zastosowano metodę destylacji z parą wodną wierzchołków tej rośliny pozyskanych w 2010 r. z polskiej odmiany Beniko. Olejek eteryczny uzyskano w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Pętkowie.

Użyty do badań olejek konopny był klarowną cieczą o barwie jasnożółtej i swoistym zapachu konopi. Jego gęstość wynosiła 0,835 g/cm³ (20°C). Zawartość Δ^9 -tetrahydrokanabinoidu oznaczono w nim na poziomie 0,01%. Zawartość głównych składników olejku konopnego została podana w tabeli 1.

Badane drobnoustroje

W badaniach użyto 61 szczepów drobnoustrojów, w tym 6 szczepów bakterii Gram-dodatnich, 7 szczepów bakterii Gram-ujemnych, 16 szczepów grzybów drożdżoidalnych, 29 szczepów dermatofitów i 3 szczepy grzybów pleśniowych. Badania uwzględniały szczepy wzorcowe pochodzące z kolekcji międzynarodowych

Tabela 1. Zawartość głównych składników olejku konopnego użytego w badaniach.

Składniki olejku	Zawartość (%)
β-Myrcen	40,3
Tlenek cymenu	16,3
trans-Kariofilen	12,8
α-Pinen	9,5
Limonen	7,8
β-Pinen	4,6
α-Humulen	3,6
trans-β-Farnezen	2,4
Tlenek (-)-kaprofilu	1,8
Terpinolen	0,5
Δ ³ -Karen	0,4

(ATCC, CNCTC, PZH), a także szczepy wyizolowane z materiału klinicznego z oddziałów dermatologicznych i pediatrycznych oraz szczepy wyizolowane z surowców zielarskich i leków pochodzenia roślinnego. Szczepy przechowywano na pożywkach stałych w temp. 4-6°C, przesiewając je raz w miesiącu na świeże podłoża. Bakterie przechowywano na Antibiotic Agar, grzyby drożdżoidalne i pleśniowe na Sabouraud Agar, a dermatofity na podłożu stałym DTM; wszystkie podłoża firmy Merck.

Określanie aktywności antybiotycznej

Olejek konopny w ilości 200 mg rozpuszczano w 1 ml dimetylosulfotlenku (DMSO) (Fluka), otrzymując roztwór podstawowy o stężeniu 200 mg/ml. Z tego roztworu przygotowywano następnie w płynnym podłożu bakteriologicznym Antibiotic Broth (Merck) (bakterie) lub w płynnym podłożu Sabouraud Broth (Merck) (grzyby drożdżoidalne, pleśniowe i dermatofity) rzędy rozcieńczeń olejku konopnego w zakresie stężeń od 0,1 do 20 mg/ml. Do każdego rozcieńczenia olejku w podłożu bakteriologicznym o objętości 1 ml dodawano po 0,1 ml hodowli lub zawiesiny badanych szczepów drobnoustrojów odpowiednio rozcieńczonych w tym samym podłożu płynnym (liczba dodawanych komórek lub strząpek mieściła się w granicach 10⁴-10⁵ w 1 ml). W badaniach używano 18-godz. hodowli bakterii, 24-godz. hodowli grzybów drożdżoidalnych oraz zawiesin otrzymanych przez zmywanie ze skosów agarowych 5-7-dniowych hodowli grzybów pleśniowych i dermatofitów (stosowano 3 ml fizjologicznego roztworu NaCl na skos agarowy).

Inkubację próbek prowadzono w temp. 37°C przez 18 godz. (bakterie), 24 godz. (grzyby drożdżoidalne) i 5-7 dni (grzyby pleśniowe i dermatofity). Po tym czasie określano najmniejsze stężenie olejku konopnego (w mg/ml) hamujące rozwój badanych szczepów drobnoustrojów (MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*). Wartości te przeliczano następnie na jednostki antybiotyczne (JA), przyjmując, że wartość MIC olejku konopnego równa jest 1 JA. Wyniki podawano w odniesieniu do 1 g olejku konopnego. Dla przykładu MIC określone dla danego

szczepu jako 1 mg/ml wskazuje, że 1 g olejku konopnego odznacza się aktywnością antybiotyczną wobec tego szczepu drobnoustroju równą 1000 JA.

Wyniki i ich omówienie

Wyniki badań przedstawione w tabelach 2-4 wskazują, że bakterie Gram-dodatnie odznaczały się aktywnością antybiotyczną w granicach 200-2000 JA, bakterie Gram-ujemne w granicach 70-135 JA, grzyby drożdżoidalne w granicach 1000-13500 JA, grzyby pleśniowe w granicach 135-400 JA i dermatofity w granicach 400-4000 JA.

Tabela 2. Aktywność antybiotyczna olejku konopnego wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Nazwa drobnoustroju	Aktywność antybiotyczna	
	MIC (mg/ml)	JA
Bakterie Gram-dodatnie		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	2,5	400
<i>Staphylococcus aureus</i> S1	2,5	400
<i>Staphylococcus epidermidis</i> S3	5,0	200
<i>Micrococcus subflava</i> M4	1,0	1000
<i>Enterococcus faecium</i> 34 B/8	0,5	2000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 8040	0,5	2000
Bakterie Gram-ujemne		
<i>Escherichia coli</i> PZH 026B6	15,0	70
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 231	7,5	135
<i>Enterobacter aerogenes</i> 35 B/10	15,0	70
<i>Proteus vulgaris</i> OWG 425	10,0	100
<i>Proteus mirabilis</i> 2050	10,0	100
<i>Salmonella enteritidis</i> S59	7,5	135
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S 85/2	7,5	135

Tabela 3. Aktywność antybiotyczna olejku konopnego wobec grzybów drożdżoidalnych i pleśniowych.

Nazwa drobnoustroju	Aktywność antybiotyczna	
	MIC (mg/ml)	JA
Grzyby drożdżoidalne		
<i>Candida albicans</i> PCM 1409 PZH	0,25	4000
<i>Candida albicans</i> MC-1	0,25	4000
<i>Candida albicans</i> MC-5	0,25	4000
<i>Candida albicans</i> MC-14	0,5	2000
<i>Candida albicans</i> S1	0,075	13500
<i>Candida albicans</i> 14/OK	0,075	13500
<i>Candida albicans</i> 29/10/98	0,075	13500
<i>Candida albicans</i> EHK	0,5	2000
<i>Candida krusei</i> S2/20	0,25	4000
<i>Candida krusei</i> SK5	0,25	4000
<i>Candida guilliermondii</i> SK11	0,25	4000
<i>Candida parapsilosis</i> CNCTC 8/44/17	0,5	2000
<i>Geotrichum candidum</i> SK 15	0,5	200
<i>Geotrichum candidum</i> 25/OWG	1,0	1000
<i>Geotrichum candidum</i> SK 20	0,5	2000
<i>Rhodotorula rubra</i> R 32	0,25	4000
Grzyby pleśniowe		
<i>Aspergillus flavus</i> 95/1	5,0	200
<i>Penicillium candidum</i> IPZ/1	2,5	400
<i>Penicillium chrysogenum</i> 33	7,5	135

Tabela 4. Aktywność antybiotyczna olejku konopnego wobec dermatofitów.

Nazwa drobnoustroju	Aktywność antybiotyczna	
	MIC (mg/ml)	JA
<i>Microsporum gypseum</i> K1	0,75	1350
<i>Microsporum gypseum</i> K2	0,5	2000
<i>Microsporum canis</i> 5A	2,5	400
<i>Microsporum canis</i> 5B	2,5	400
<i>Microsporum canis</i> 25	0,75	1350
<i>Microsporum canis</i> 26	2,5	400
<i>Microsporum canis</i> 28	2,0	500
<i>Microsporum canis</i> 30	2,0	500
<i>Microsporum canis</i> 31	1,5	700
<i>Microsporum canis</i> 32	2,0	500
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 7	2,5	400
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 8	2,5	400
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 9	2,5	400
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 10	1,0	1000
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 11	1,0	1000
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 12	1,0	1000
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 13	2,5	400
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 24	2,5	400
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> M4	2,5	400
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> 14	0,75	1350
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> 15	0,25	4000
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> 16	1,5	700
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> 17	1,0	1000
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> 18	1,5	700
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> 19	1,5	700
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> 20	1,5	700
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> 21	0,75	1350
<i>Trichophyton rubrum</i> 23	1,0	1000
<i>Trichophyton violaceum</i> 34	2,0	500

Na tej podstawie można przyjąć, że największą aktywnością antybiotyczną odznaczał się olejek konopny wobec grzybów drożdżoidalnych. Mniejszą aktywność wykazywał on w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich i dermatofitów oraz najmniejszą wobec bakterii Gram-ujemnych i grzybów pleśniowych.

Uzyskane wyniki badań w pewnym stopniu zgodne są z wynikami otrzymanymi przez Nissena i wsp. (5), a mianowicie wskazują one, że działanie olejku konopnego na bakterie Gram-dodatnie i grzyby drożdżoidalne jest znacznie silniejsze w porównaniu do działania tego olejku na bakterie Gram-ujemne.

Wnioski

1. Olejek konopny wykazuje wysoką aktywność antybiotyczną w odniesieniu do grzybów drożdżo-

idalnych i stosunkowo wysoką aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i dermatofitów, tj. drobnoustrojów wywołujących w większości zakażenia dermatologiczne u ludzi i zwierząt.

2. Olejek konopny może znaleźć zastosowanie praktyczne jako składnik preparatów dermatologicznych i kosmetycznych.

Piśmiennictwo

1. Burczyk H, Kowalski M, Pławuszczyński M. The trends and methods of hemp breeding in Poland. *J Nat Fibr* 2005; (2).
2. Burczyk H, Grabowska L, Kołodziej J i wsp. The industrial hemp as a raw material in the energy production. *J Ind Hemp* 2008; 13(1):37-48.
4. Burczyk H, Kaniewski R, Konczewicz W i wsp. Konopie włókniste źródłem olejków eterycznych. *Pam Puławski* 2009; 151(1):37-47).
5. Nissen L, Zatta A, Stefanini I i wsp. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.).

otrzymano/received: 03.07.2014
zaakceptowano/accepted: 14.07.2014

Adres/address:
*prof. dr hab. Bogdan Kędzia
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Libelta 27, 61-707 Poznań
tel. +48 (61) 665-95-50, fax: (61) 665-95-51
e-mail: bogdan.kedzia@iwnirz.pl