

*Anna Kędzia¹, Elżbieta Hołderna-Kędzia²

Wpływ olejku świerkowego (*Oleum Picea excelsa*) na bakterie beztlenowe

Influence of spruce oil (*Oleum Picea excelsa*) on anaerobic bacteria

¹Emerytowany profesor dr hab. n. med. Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

²Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Dyrektor Instytutu: dr hab. inż. Małgorzata Zimmiewska, prof. IWNiRZ

SUMMARY

Introduction. Spruce (*Picea abies* L.) is a member of family Pinaceae. It was known and used in ancient. The tree grown to 50 m height. Produced by conifers etheric oil possesses antibacterial, antifungal and antioxidant properties. The major compounds of the spruce oil are: pinene, cadinene and felandrene. It is obtained hydro distillation method.

Aim. The aim of the date was to investigate activity of spruce oil against anaerobic bacteria.

Material and methods. The 53 of anaerobic bacteria isolated from oral cavity and upper respiratory tract, in it 32 strains of Gram-negative rods, 12 Gram-positive rods and 9 Gram-positive cocci were tested. Moreover investigated 8 reference strains. Susceptibility (MIC) was determined by two-fold dilution technique in Brucella agar with 5% defibrinated sheep blood, menadione and hemin. The spruce oil was dissolved in DMSO and distilled water to obtained a final concentrations 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 and 20.0 mg/ml. The inoculums containing 10⁶ CFU/ml was seeded with Steers replicator upon the surface of agar with oil or without tested essential oil (strains growth control). Incubation the agar plates was performed in anaerobic conditions in anaerobic jars containing 10% CO₂, 10% H₂ and 80% N₂, palladic catalyst and anaerobic indicator, at 37°C for 48 hrs. The MIC was established as the lowest concentration of the spruce oil that inhibiting the growth of tested anaerobes.

Results. The results of these investigations indicated that the most susceptible to spruce oil from Gram-negative bacteria were the strains *Prevotella intermedia* (MIC 5.0-10.0 mg/ml) and *Porphyromonas levii* (MIC = 7.5 mg/ml). The growth of strain from genus *Bacteroides fragilis* was inhibited by concentration > 20.0 mg/ml, and *Tannerella forsythia* in ranges from 15.0 to > 20.0 mg/ml. The Gram-positive bacteria were more susceptible. The growth of 50% of this rods was inhibited in concentration 2.5-7.5 mg/ml. From Gram-positive rods from genus of *Actinomyces odontolyticus* were the most susceptible. The 75% of the rods were inhibited by spruce oil in concentrations 2.5-7.5 mg/ml. The least sensitive was the strain *Actinomyces viscosus* (MIC = 15.0 mg/ml). The tested oil was more active on account Gram-positive cocci. The growth was inhibited by concentrations in ranges 2.5-7.5 mg/ml. The Gram-positive cocci were more susceptible than Gram-positive rods. The data indicated that the spruce oil was more active towards Gram-positive rods than Gram-negative anaerobes.

Conclusions. From the Gram-negative bacteria the *Prevotella* rods were the more susceptible to spruce oil. The oil was the less active towards Gram-negative rods from genus *Tannerella forsythia*. From Gram-positive anaerobic bacteria the Gram-positive cocci were the more susceptible to spruce oil then Gram-positive rods.

Keywords: anaerobic bacteria, spruce oil, susceptibility, oral cavity, upper respiratory tract

STRESZCZENIE

Wstęp. Świerk pospolity (*Picea abies* L.) należy do rodziny Pinaceae. Był on znany i stosowany w czasach starożytnych. Drzewo rośnie do wysokości 50 m. Wytwarzany przez igły olejek eteryczny (ang. spruce oil) wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne i przeciwutleniające. Głównymi składnikami olejku są: pinen, kadynen i felandren. Otrzymywany jest drogą destylacji z parą wodną.

Cel pracy. Celem badań było oznaczenie aktywności olejku świerkowego wobec bakterii beztlenowych.

Materiał i metody. Badaniami objęto 53 szczepy bakterii beztlenowych wyizolowanych z jamy ustnej i górnych dróg oddechowych, w tym 32 szczepy Gram-ujemnych pałeczek, 12 Gram-dodatnich pałeczek i 9 Gram-dodatnich ziarniaków. Ponadto zbadano 8 szczepów wzorcowych. Wrażliwość (MIC) bakterii beztlenowych na olejek świerkowy oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze *Brucella* z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej, menadionu i heminy. Olejek rozpuszczono w 1 ml DMSO w jałowej wodzie destylowanej w celu uzyskania następujących stężeń: 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 i 20,0 mg/ml. Zawiesinę z 10⁶ CFU/ml przenoszono aparatem Steersa na powierzchnię agaru zawierającego olejek lub bez olejku (kontrola wzrostu szczepów). Hodowlę agaru z posiewami prowadzono w warunkach beztlenowych w anaerostatach wypełnionych 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, zawierających katalizator palladowy oraz wskaźnik beztlenowości, w temperaturze 37°C przez 48 godzin. MIC ustalono jako najmniejsze stężenie olejku świerkowego, które zahamowało wzrost testowanych bakterii beztlenowych.

Wyniki. Wyniki badań wskazują, że spośród Gram-ujemnych bakterii najbardziej wrażliwe na olejek świerkowy były szczepy *Prevotella intermedia* (MIC 5,0-10,0 mg/ml) i *Porphyromonas levii* (MIC = 7,5 mg/ml). Wzrost szczepów z gatunku *Bacteroides fragilis* był hamowany przez stężenia > 20,0 mg/ml, a *Tannerella forsythia* w zakresie od 15,0 do > 20,0 mg/ml, Gram-dodatnie bakterie okazały się bardziej wrażliwe. Wzrost 50% Gram-dodatnich pałeczek hamowały stężenia olejku w zakresie 2,5-7,5 mg/ml. Olejek był najbardziej aktywny wobec szczepów z gatunku *Actinomyces odontolyticus*. Wzrost 75% tych pałeczek był hamowany przez olejek świerkowy w stężeniach 2,5-7,5 mg/ml. Najniższą wrażliwość wykazał szczep *Actinomyces viscosus* (MIC = 15,0 mg/ml). Badany olejek był bardziej aktywny wobec Gram-dodatnich ziarniaków niż pałeczek. Ich wzrost hamowały stężenia w zakresie 2,5-7,5 mg/ml. Wyniki wskazują, że olejek świerkowy wykazał większą aktywność wobec Gram-dodatnich pałeczek w porównaniu z Gram-ujemnymi bakteriami beztlenowymi.

Wnioski. Wśród Gram-ujemnych bakterii na olejek świerkowy najbardziej wrażliwe były pałeczki *Prevotella*. Olejek wykazał niższą aktywność wobec Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Tannerella forsythia*. Spośród Gram-dodatnich bakterii ziarniaki okazały się bardziej wrażliwe na olejek sosnowy w porównaniu z Gram-dodatnimi pałeczkami.

Słowa kluczowe: bakterie beztlenowe, olejek świerkowy, wrażliwość, jama ustna, górne drogi oddechowe

Wstęp

Drzewa i krzewy iglaste były znane i wykorzystywane w różnych celach od czasów starożytnych. Obecnie rosną one na północy Europy, w Rosji, Sudetach, Karpatach, Alpach i na Bałkanach. W Polsce świerk występuje na pogórzu, w Tatrach, zazwyczaj do wysokości 1500 m n.p.m. i powyżej (1). Jest wykorzystywany jako drzewo ozdobne w ogrodach i parkach. Może osiągać wysokość do 50 m. To zimozielone długowieczne drzewo, o średnicy pnia 1-1,5 m, ma kształt stożkowaty. Wytwarza rozległy, płytko osadzony system korzeniowy, co zmniejsza jego stabilność. Kora ma barwę szarobrazową, jasnobrazową lub brunatnoszarą i jest chropowata, łuskowato odstająca, po której ścieka żywica. Liście są sztywne, spiczaste, wąskie, długości 1,5-2,5 cm, barwy ciemnozielonej. Drzewo wytwarza jasne brązowoszare cylindryczne drobnoząbkowane szyszki o długości 10-16 cm i średnicy 3-4 cm.

Świerk pospolity (*Picea abies* L.) należy do rodziny *Pinaceae* (Sosnowate). Jest on wykorzystywany w lecznictwie. Ekstrakty z szyszek świerku wykazują działanie wykrztuśne, rozgrzewające, napotne, pobudzające, regenerujące, przeciwrheumatyczne i ściągające (2). Odwary i syropy stosowane są w zapaleniu gardła, dróg oddechowych i jamy ustnej. Nie zaleca się natomiast przyjmowania ich w krztuścu, astmie oskrzelowej i stanach zapalnych skóry.

Otrzymywany na drodze destylacji z parą wodną z igieł, gałązek oraz młodych szyszek olejek eteryczny (ang. *spruce oil*) zawiera m.in.: pinen, kadinen i felandren, a także substancje goryczkowe, garbniki i węglowodany (3). Niektóre z tych składników działają przeciwdrobnoustrojowo (2, 4-12). Dane z piśmiennictwa wskazują na aktywność olejku świerkowego wobec bakterii tlenowych i grzybów. Nieznane jest działanie tego olejku wobec bakterii beztlenowych.

Cel pracy

Celem badań była ocena aktywności olejku świerkowego wobec bakterii beztlenowych występujących w jamie ustnej i górnych drogach oddechowych.

Materiał i metody

W badaniach zostały wykorzystane bakterie beztlenowe wyhodowane z materiałów pobranych od pacjentów z zakażeniami w obrębie jamy ustnej lub górnych dróg oddechowych. Drobnoustroje zostały zidentyfikowane zgodnie z obowiązującymi zasadami z uwzględnieniem zmian taksonomicznych. Zakwalifikowane do badań bakterie należały do następujących rodzajów: *Bacteroides* (8 szczepów), *Parabacteroides* (1), *Tannerella* (2), *Prevotella* (8), *Porphyromonas* (5), *Fusobacterium* (8), *Actinomyces* (5), *Bifidobacterium* (1) i *Propionibacterium* (6), *Finogoldia* (3), *Parvimonas* (2), *Peptostreptococcus* (4). Do doświadczeń włączono też 8 szczepów wzorcowych z gatunków: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25585, *Porphyromonas asaccharolytica* ATCC 38128, *Porphyromonas levii* ATCC 29147, *Finogoldia magna* ATCC 29328, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 i *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

Wrażliwość wymienionych bakterii beztlenowych na olejek świerkowy (Semifarm) oznaczono, wykorzystując metodę seryjnych rozcieńczeń w agarze *Brucella* zawierającym 5% odwłóknionej krwi baraniej, menadion i heminę. Testowany olejek został najpierw rozpuszczony w 1 ml DMSO (Serva), a następnie zawieszony w jałowej wodzie destylowanej. Użyte do badań rozcieńczenia były następujące: 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 i 20,0 mg/ml. Hodowlę bakteryjną, zawierającą 10⁶ CFU/ml, przenoszono na powierzchnię podłoża aparatem Steersa. Agar zawierający odpowiednie rozcieńczenia olejku lub bez jego dodatku (kontrola wzrostu szczepów) był inkubowany w anaerostatach

wypełnionych mieszaniną gazów; 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, zawierających katalizator palladowy oraz wskaźnik beztlenowości, w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Za MIC uznano takie najmniejsze rozcieńczenie olejku świerkowego, które prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu testowanych bakterii beztlenowych.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki badań Gram-ujemnych bakterii beztlenowych zamieszczono w tabeli 1, Gram-dodatnich bakterii w tabeli 2, a szczepów wzorcowych w tabeli 3. Otrzymane dane wskazują, że wśród Gram-ujemnych pałeczek najbardziej wrażliwe były gatunki *Prevotella intermedia* (MIC 5,0-10,0 mg/ml) oraz *Porphyromonas levii* (MIC = 7,5 mg/ml). Natomiast wzrost 87,5% pałeczek z rodzaju *Bacteroides* był hamowany przez stężenia w zakresie 5,0-15,0 mg/ml. Szczep z gatunku *Bacteroides fragilis* był wrażliwy na stężenie > 20,0 mg/ml. Wobec Gram-ujemnych pałeczek z gatunków *Porphyromonas asaccharolytica* i *Parabacteroides distasonis* olejek był aktywny w stężeniach 10,0-15,0 mg/ml, a w przypadku gatunku *Tannerella forsythia* w stężeniach 15,0-> 20,0 mg/ml. Szczepy badanych wrzeczionkowców wykazały podobną

wrażliwość. Wśród nich wzrost 5 (62,5%) szczepów był hamowany w zakresie stężeń wynoszących 5,0-10,0 mg/ml. Jednak pozostałe szczepy okazały się wrażliwe na 20,0 mg/ml olejku i więcej. Należy podkreślić, że na niskie stężenia olejku w zakresie 5,0-7,5 mg/ml było wrażliwych 28% testowanych pałeczek beztlenowych.

Gram-dodatnie pałeczki charakteryzowały się wyższą wrażliwością. Olejek świerkowy w zakresie 2,5-7,5 mg/ml hamował wzrost 50% testowanych szczepów. Największą aktywność olejek wykazał wobec szczepów z gatunku *Actinomyces odontolyticus*. Wzrost 75% tych pałeczek hamowały stężenia olejku wynoszące 2,5-7,5 mg/ml. Najmniejszą wrażliwością charakteryzowały się szczepy z gatunku *Actinomyces viscosus* (MIC = 15,0 mg/ml). Natomiast olejek wykazał wyższą aktywność w działaniu wobec Gram-dodatnich ziarniaków w porównaniu z pałeczkami. Wzrost 67% szczepów był hamowany w zakresie stężeń wynoszących 2,5-7,5 mg/ml. Największą wrażliwość wykazały szczepy z gatunku *Parvimonas micra*. Ich wzrost był hamowany przez 5,0 mg/ml olejku.

Wyniki badań innych autorów potwierdzają przeciwdrobnoustrojowe działanie olejku świerkowego (2, 4-9, 11, 14, 15). Doświadczenia Rautio i wsp. (8) wskazują

Tab. 1. Wrażliwość Gram-ujemnych bakterii beztlenowych na olejek świerkowy

Bakterie beztlenowe	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		≥ 20,0	15,0	10,0	7,5	5,0	≤ 2,5
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	1					
<i>Bacteroides uniformis</i>	2			1	1		
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	4		2	1	1		
<i>Bacteroides vulgates</i>	1		1				
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1		1				
<i>Prevotella bivia</i>	2	1		1			
<i>Prevotella buccalis</i>	1			1			
<i>Prevotella intermedia</i>	4			1	1	2	
<i>Prevotella loescheii</i>	1		1				
<i>Porphyromonas levii</i>	1				1		
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	4		2	2			
<i>Tannerella forsythia</i>	2	1	1				
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4	2		1		1	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	4	1		1	1	1	
Gram-ujemne bakterie beztlenowe ogółem	32	6	8	9	5	4	

Tab. 2. Wrażliwość Gram-dodatnich bakterii beztlenowych na olejek świerkowy

Bakterie beztlenowe	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		≥ 20,0	15,0	10,0	7,5	5,0	≤ 2,5
<i>Fingoldia magna</i>	3		2				1
<i>Parvimonas micros</i>	2					2	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	4	1			1	1	1
Gram-dodatnie beztlenowe ziarniaki ogółem	9	1	2		1	3	2
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4		1		1	1	1
<i>Actinomyces viscosus</i>	1		1				
<i>Propionibacterium acnes</i>	2		1			1	
<i>Propionibacterium granulosum</i>	4		2	1		1	
<i>Bifidobacterium breve</i>	1				1		
Gram-dodatnie pałeczki ogółem	12		5	1	2	3	1
Bakterie beztlenowe łącznie	53	7	15	10	8	10	3

Tab. 3. Wrażliwość szczepów wzorcowych bakterii beztlenowych na olejek świerkowy

Bakterie beztlenowe	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		≤ 20,0	15,0	10,0	7,5	5,0	≤ 2,5
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1	1					
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25583	1	1					
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> ATCC 29943	1				1		
<i>Porphyromonas levii</i> TCC 45586	1				1		
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700	1				1		
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	1				1		
<i>Fingoldia magna</i> ATCC 29328	1		1				
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	1	1					

na bakteriostatyczną aktywność wobec Gram-dodatnich bakterii oraz w przypadku Gram-ujemnych jedynie w stosunku do pałeczek *Proteus vulgaris*. Inni autorzy opisali oddziaływanie olejków z drzew szpilkowych (stężenia 3,5-13 mg/ml) na szczepy pałeczek *Klebsiella pneumoniae* (13). Dane potwierdzają też działanie olejków jodłowych na różne drobnoustroje, w tym m.in.: *Bacillus brevis* (obecnie *Bifidobacterium breve*), *Bacillus cereus*,

Bacillus subtilis, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium sporogenes*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* i *Aspergillus flavus* var. *oryzae* (6, 7, 11, 13-15).

Z przedstawionych powyżej badań wynika, że olejek świerkowy był aktywny wobec różnych gatunków bakterii beztlenowych. Okazał się bardziej skuteczny

w działaniu wobec Gram-dodatnich szczepów w porównaniu z Gram-ujemnymi bakteriami. W stężeniach wynoszących 2,5-7,5 mg/ml hamował wzrost 57% szczepów Gram-dodatnich ziarniaków i pałeczek oraz 28% Gram-ujemnych pałeczek beztlenowych. Wśród Gram-dodatnich drobnoustrojów większą wrażliwością charakteryzowały się Gram-dodatnie ziarniaki niż pałeczki. Olejek świerkowy hamował odpowiednio wzrost 67 i 50% tych drobnoustrojów.

Wnioski

1. Największą wrażliwość na olejek świerkowy wykazały szczepy z rodzaju *Prevotella*.
2. Olejek był najmniej aktywny wobec Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Tannerella forsytha*.
3. Spośród Gram-dodatnich bakterii większą wrażliwością charakteryzowały się Gram-dodatnie ziarniaki w porównaniu z pałeczkami.

Piśmiennictwo

1. Zawijacz-Kozica T. Jodła u kresu. Tatry 2012; 1(39):43.
2. Lamer-Zarawska E. Profilaktyka schorzeń infekcyjnych układu oddechowego u dzieci. Panacea 2007; 1(18):12-5.
3. Bharat CS, Parven D. Evaluation of *in vitro* antimicrobial potential and phytochemical analysis of spruce, cajeput and jamrosa essential oil against clinical isolates. Int J Green Pharmacy 2016; 10(1):27-32.
4. Sienkiewicz M, Denys P, Kowalczyk E. Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils. Int Rev Allergol Clin Immunol 2011; 17:1-2.
5. Karting T, Still F, Reinthaler F. Antimicrobial activity of essential of young pine shoots (*Picea abies* L.). J Ethnopharmacol 1991; 35(2):155-7.
6. Kozłowski G, Metraux J-P. Antifungal properties of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedling homogenates. Acta Soc Botan Poloniae 1999; 68(3):191-5.
7. Mercier B, Prost J, Prost M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinen): A review. Int J Occupational Med Environ Health 2009; 22(4):331-42.
8. Rautio M, Sipponen A, Peltola R i wsp. Antibacterial effects of home made resin salve from Norway spruce (*Picea abies*). J Pathol Microbiol Immunol 2007; 115(4):335-40.
9. Nurzyńska-Wierdak R. Aktywność biologiczna olejków eterycznych roślin z rodziny *Pinaceae*. Ann UMCS, Sec III Horticult 2015; 25(3):19-26.
10. Bojarczuk A, Skibiński R, Komsta Ł. Multivariate analysis of UV spectra of complex herbal mixtures and essential oils. Ann Univ MCS, Sec DDD 2009; 22(2):69-73.
11. Survilienė E, Valinūškaitė A, Snieškienė V i wsp. Effect of essential oils on fungi isolated from apples and vegetables. Sci Works Lithuanian Inst Horticult Lithuanian Univ Agriculture Sodininkyste Daržininkyste 2009; 28(3):227-34.
12. Garry RP, Chalchat JC, Michael A. Huiles essentielles de resineux: nouvelles matieres premieres pour la parfumerie. Paromatherapie. Riv Ital EPPOS 1991; 1(4):37-49.
13. Kalembe D. Przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe właściwości olejków eterycznych. Post Microbiol 1998; 18(2):185-203.
14. Pichette A, Larouche PL, Lebrun M i wsp. Composition and antimicrobial activity of *Abies balsamea* essential oil. Phytother Res 2006; 20(5):371-3.
15. Krauze-Baranowska M, Mardarowicz M, Wiwart M i wsp. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. Z Naturforsch (C) 2002; 57(5-6):487-9.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

otrzymano/received: 10.11.2018

zaakceptowano/accepted: 16.01.2019

Adres/address:

*prof. dr hab. n. med. Anna Kędzia
ul. Małachowskiego 5/5
80-262 Gdańsk Wrzeszcz
e-mail: anak@gumed.edu.pl