

*Anna Kędzia¹, Andrzej W. Kędzia²

Aktywność olejku pichtowego (*Oleum Pichtae*) wobec bakterii beztlenowych

The activity of pichtae oil (*Oleum Pichtae*) against anaerobic bacteria

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

²Klinika Diabetologii Klinicznej i Pielęgniarstwa Pediatricznego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Kliniki: dr hab. n. med. Andrzej W. Kędzia, prof. nadzw.

SUMMARY

Introduction. *Abies whitebark* (*Abies sibirica* L.) belonging to the family Pinaceae. The tree grown in Mongol, China and Siberian taiga. Produced the pichtae oil, which is obtained by hydrodistillation method. It contain: α -pinene, β -pinene, β -caryophyllene, bornyl acetate, camphene, kamfen, mircene and cineole. The oil exhibiting expectorant, analgesic, anti-inflammatory, antiallergic, liver restorative, adaptogenic and antioxidant properties. It has antimicrobial activity.

Aim. The aim of the date was to determine the susceptibility of anaerobic bacteria isolated from patients to pichtae oil.

Material and methods. The investigated 49 strains of bacteria isolated from patients from genus *Bacteroides* (7 strains), *Parabacteroides* (1), *Prevotella* (8), *Porphyromonas* (5), *Tannerella* (1), *Fusobacterium* (6), *Finegoldia* (4), *Parvimonas* (2), *Peptostreptococcus* (4), *Actinomyces* (4), *Bifidobacterium* (1), *Propionibacterium* (6), and 10 reference strains. The concentrations the oil were the following: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 and 20.0 mg/ml. The pichtae oil was added to Brucella agar with 5% defibrinated sheep blood, menadione and hemin. Inoculum containing 10^6 CFU/ml was seeded with Steers replicator upon the agar with oil or without oil (strains growth control). The incubation was carried out 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 defined as the lowest concentration of the pichtae oil that completely inhibited growth the anaerobic bacteria.

Results. The results investigation indicated that from Gram-negative rods *Tannerella forsythia* (MIC = 5.0 mg/ml), *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides uniformis* (MIC = 7.5 mg/ml) were the most susceptible to pichtae oil. The growth of *Prevotella* strains were inhibited by concentrations in ranges 5.0-15.0 mg/ml. The *Prevotella bivia* (MIC 10.0-15.0 mg/ml) and *Prevotella buccalis* (MIC = 15.0 mg/ml) were the most resistant. The tested oil was active on account genus of *Fusobacterium* strains in concentrations 5.0-10.0 mg/ml. The Gram-positive cocci were the more sensitive then rods. The growth was inhibited by concentrations in ranges \leq 2.5-10.0 mg/ml. The oil was equally effective against Gram-positive rods (MIC \leq 2.5-10.0 mg/ml). From this bacteria the more susceptible were the strains of *Actinomyces* (MIC \leq 2.5-7.5 mg/ml) and the least a rods from genus of *Bifidobacterium* (MIC = 10.0 mg/ml). The date indicated, that the Gram-positive anaerobes were the more susceptible to pichtae oil than Gram-negative rods.

Conclusions. From among the Gram-negative bacteria the more susceptible to pichtae oil were the rods from genus *Tannerella forsythia*, *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides uniformis*. Gram-positive anaerobic cocci were the more susceptible then Gram-positive rods. The pichtae oil was the more active towards Gram-positive bacteria then Gram-negative anaerobic rods.

Keywords: susceptibility, anaerobic bacteria, activity, oleum pichtae

STRESZCZENIE

Wstęp. Jodła białokorowa (*Abies sibirica* L.) należy do rodziny Pinaceae. Drzewo rośnie w Mongolii, Chinach i na Syberii. Wytwarza olejek pichtowy, który otrzymywany jest metodą destylacji z parą wodną. Olejek zawiera m.in.: α -pinen, β -pinen, β -kariofyllen, octan bornyłu, kamfen, myrcen i cyneol. Wykazuje działanie wykrztuśne, przeciwbólowe, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, odnawiające wątrobę, adaptogenne i przeciwtulenające. Wykazuje też aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Cel pracy. Celem badań było oznaczenie wrażliwości na olejek pichtowy bakterii beztlenowych wyizolowanych z jamy ustnej i dróg oddechowych pacjentów.

Materiał i metody. Badaniami objęto 49 szczepów bakterii wyizolowanych od pacjentów z rodzajów: *Bacteroides* (7 szczepów), *Parabacteroides* (1), *Prevotella* (8), *Porphyromonas* (5), *Tannerella* (1), *Fusobacterium* (6), *Finegoldia* (4), *Parvimonas* (2), *Peptostreptococcus* (4), *Actinomyces* (4), *Bifidobacterium* (1) i *Propionibacterium* (6) oraz 10 szczepów wzorcowych. Do badań użyto następujące stężenia olejku: 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 i 20,0 mg/ml. Olejek pichtowy dodawano do agaru Brucella z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej, menadionu i heminy. Zawiesinę bakteryjną zawierającą 10^6 CFU/ml наносzono aparatem Steersa na powierzchnię agaru z olejkiem lub bez niego (kontrola wzrostu szczepów). Hodowlę prowadzono w warunkach beztlenowych w anaerostatach zawierających mieszaninę gazów: 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, katalizator palladowy oraz wskaźnik beztleno-

wości, w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Za MIC przyjęto takie najmniejsze rozcieńczenie olejku pichtowego, które całkowicie hamowało wzrost bakterii beztlenowych.

Wyniki. Wyniki badań wskazują, że najbardziej wrażliwe na olejek były pałeczki *Tannerella forsythia* (MIC = 5,0 mg/ml) oraz *Bacteroides fragilis* i *Bacteroides uniformis* (MIC = 7,5 mg/ml). Wzrost szczepów *Prevotella* był hamowany przez stężenia w zakresie 5,0-15,0 mg/ml. Największą oporność wykazały szczepy z gatunków *Prevotella bivia* (MIC 10,0-15,0 mg/ml) i *Prevotella buccalis* (MIC = 15,0 mg/ml). Badany olejek był aktywny wobec szczepów z rodzaju *Fusobacterium* w stężeniach 5,0-10,0 mg/ml. Gram-dodatnie ziarniki charakteryzowały się wyższą wrażliwością. Ich wzrost hamowały stężenia olejku w zakresie ≤ 2,5-10,0 mg/ml. Podobnie aktywny był olejek wobec Gram-dodatnich pałeczek (MIC w zakresie ≤ 2,5-10,0 mg/ml). Wśród nich największą wrażliwość wykazały szczepy *Actinomyces* (MIC ≤ 2,5-7,5 mg/ml), a najniższą pałeczki z gatunku *Bifidobacterium* (MIC = 10,0 mg/ml). Badania wskazują, że Gram-dodatnie bakterie były bardziej wrażliwe na olejek pichtowy w porównaniu z Gram-ujemnymi pałeczkami.

Wnioski. Spośród Gram-ujemnych bakterii najbardziej wrażliwe na olejek pichtowy były pałeczki *Tannerella forsythia*, *Bacteroides fragilis* i *Bacteroides uniformis*. Gram-dodatnie ziarniki beztlenowe okazały się bardziej wrażliwe w porównaniu z Gram-dodatnimi pałeczkami. Olejek pichtowy był bardziej aktywny wobec ocenianych Gram-dodatnich bakterii niż Gram-ujemnych pałeczek beztlenowych.

Słowa kluczowe: wrażliwość, bakterie beztlenowe, działanie, olejek pichtowy

Wstęp

W wielu krajach w starożytności olejki eteryczne były stosowane jako środki lecznicze zapachowe lub rytualne. Już Egipcjanie olejku otrzymywanego z igieł jodły (*Abies alba*) używali w formie odżywki do włosów. Hipokrates polecał jodłę w przypadku zakażeń dróg oddechowych. W XIX wieku olejek stosowano do leczenia chorób skóry, tj. egzemy i łuszczyca (1).

Jodła białokorowa, zwana też jodłą syberyjską lub pichtą syberyjską (*Abies sibirica* L. lub *Pinus sibirica* Led., Turcz.), należy do rodziny *Pinaceae*. Drzewo osiąga wysokość do 40 m. Wytwarza wiecznie zielone iglaste liście długości 3 cm i szerokości 1-2 mm oraz cylindryczne szyszki skierowane do góry, długości do 8 cm. Drzewo rośnie w Mongolii, Chinach i na Syberii. Wytwarza olejek eteryczny zwany pichtowym. Otrzymuje się go ze świeżych szczytów pędów i szpilek jodły syberyjskiej metodą destylacji z parą wodną (1).

Olejek ma barwę żółtozieloną lub jest bezbarwny, o silnym aromatycznym zapachu i gorzkim smaku. W jego składzie są obecne różne związki, w tym: α-pinen, β-pinen, β-kariofyllen, octan bornylu, kamfen, myrcen i cyneol (2). Skład olejku zależy od regionu geograficznego, w którym wyrosło drzewo, a także metody jego otrzymywania (3). Wykazuje on m.in. działanie wykrztuśne, przeciwbólowe, przeciwzapalne, przeciwalergiczne i odnawiające wątrobę (4-7). Przeprowadzone badania udowodniły jego aktywność adaptogenną i przeciwutleniającą (8). Ponadto doświadczalnie wykazano też przeciwdrobnoustrojowe działanie olejku pichtowego (2, 5, 7-15). W piśmiennictwie opisano aktywność olejku wobec bakterii tlenowych oraz grzybów drożdżopodobnych, pleśniowych i dermatofitów, brakuje

jednak danych na temat jego działania na bakterie beztlenowe.

Cel pracy

Celem badań było oznaczenie wrażliwości na olejek pichtowy bakterii beztlenowych wyizolowanych z jamy ustnej i górnych dróg oddechowych pacjentów.

Materiał i metody

Badaniom poddano łącznie 49 szczepów bakterii wyizolowanych od pacjentów oraz 10 szczepów wzorcowych. Drobnoustroje należały do następujących rodzajów: *Bacteroides* (7 szczepów), *Parabacteroides* (1), *Prevotella* (8), *Porphyromonas* (5), *Tannerella* (1), *Fusobacterium* (6), *Finegoldia* (4), *Parvimonas* (2), *Peptostreptococcus* (4), *Actinomyces* (4), *Bifidobacterium* (1) i *Propionibacterium* (6), a szczepy wzorcowe do gatunków: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503, *Porphyromonas levii* ATCC 29147, *Porphyromonas levii* ATCC 29147, *Porphyromonas asaccharolytica* ATCC 38128, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25585, *Tannerella forsythia* ATCC 58848, *Finegoldia magna* ATCC 29328, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 oraz *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

Wykorzystany do badań olejek pichtowy (KEJ) został najpierw rozpuszczony w 1 ml DMSO (Serva), a następnie zawieszony w jałowej wodzie destylowanej. Uzyskane rozcieńczenia wynoszące 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 i 20,0 mg/ml dodawano do agaru *Brucella* z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej, menadionu i heminy. Zawiesinę bakteryjną, która zawierała 10⁶ CFU/ml, наносzono aparatem Steersa na powierzchnię podłoża z dodatkiem

badanego olejku lub bez niego (kontrola wzrostu szczepów). Hodowlę podłoży prowadzono w warunkach beztlenowych w anaerostatach, które zawierały mieszaninę gazów: 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, katalizator palladowy oraz wskaźnik beztlenowości, w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Za MIC przyjęto takie najmniejsze stężenie olejku pichtowego, które całkowicie hamowało wzrost bakterii beztlenowych.

Wyniki i omówienie

Tabela 1 zawiera wyniki badań Gram-ujemnych bakterii, tabela 2 Gram-dodatnich bakterii, a tabela 3 szczepów wzorcowych bakterii beztlenowych. Badania wykazały, że na Gram-ujemne pałeczki olejek pichtowy działał w zakresie 5,0-15,0 mg/ml. Wśród nich największą wrażliwością charakteryzowały się pałeczki *Tannerella forsythia* (MIC = 5,0 mg/ml), *Bacteroides fragilis* i *Bacteroides uniformis* (MIC = 7,5 mg/ml). Wzrost szczepów z rodzaju *Prevotella* hamowały stężenia w zakresie 5,0-15,0 mg/ml. Największą oporność wykazały szczepy z gatunków *Prevotella bivia* (MIC 10,0-15,0 mg/ml) i *Prevotella buccalis* (MIC = 15,0 mg/ml). Wśród

rodzaju *Porphyromonas* najmniejszą wrażliwością charakteryzował się gatunek *Porphyromonas levii* (MIC = 10,0 mg/ml). Badania wykazały, że olejek pichtowy był aktywny w stężeniach 5,0-10,0 mg/ml wobec szczepów z rodzaju *Fusobacterium*.

W przypadku Gram-dodatnich beztlenowców, najbardziej wrażliwe na olejek okazały się ziarniaki. Ich wzrost hamowały stężenia w zakresie ≤ 2,5-10,0 mg/ml. Olejek działał najbardziej aktywnie wobec gatunku *Peptostreptococcus anaerobius* (MIC ≤ 2,0-7,5 mg/ml). Podobną do ziarniaków wrażliwość wykazały badane Gram-dodatnie pałeczki (MIC w zakresie ≤ 2,5-10,0 mg/ml). Spośród nich szczepy *Actinomyces* okazały się najbardziej wrażliwe. Stężenia olejku hamującego wzrost kształtowały się w zakresie ≤ 2,5-7,5 mg/ml. Natomiast był on najmniej aktywny wobec pałeczek z gatunku *Bifidobacterium breve*. Ich wzrost hamowały stężenia wynoszące 10,0 mg/ml. Z badań wynika, że Gram-ujemne pałeczki charakteryzowały się niższą wrażliwością na olejek pichtowy w porównaniu z Gram-dodatnimi ziarniakami i pałeczkami. Wskazują na to zakresy stężeń hamujących wzrost bakterii. Dla Gram-ujemnych pałeczek MIC kształtowało się w zakresie 5,0-15,0 mg/ml, a dla

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

| 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> | 2 | | | | 2 | | |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 2 | | | | 2 | | |
| <i>Bacteroides ureolyticus</i> | 2 | | | 2 | | | |
| <i>Bacteroides vulgatus</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> | 3 | | 1 | | | 2 | |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 2 | | 1 | | | 1 | |
| <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> | 4 | | | 2 | 1 | 1 | |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Tannerella forsythia</i> | 1 | | | | | 1 | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 3 | | | 1 | | 2 | |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> | 3 | | | 2 | 1 | | |
| Gram-ujemne bakterie beztlenowe ogółem | 28 | | 4 | 11 | 6 | 7 | |

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

| Bakterie beztlenowe | Liczba szczepów | Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml) | | | | | |
|---|-----------------|---|------|------|-----|-----|-------|
| | | ≥ 20,0 | 15,0 | 10,0 | 7,5 | 5,0 | ≤ 2,5 |
| <i>Finegoldia magna</i> | 4 | | | 1 | | 1 | 2 |
| <i>Parvimonas micra</i> | 2 | | | 1 | 1 | | |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | 4 | | | | 2 | 1 | 1 |
| Gram-dodatnie ziarniaki beztlenowe ogółem | 10 | | | 2 | 3 | 2 | 3 |
| <i>Actinomyces odontolyticus</i> | 2 | | | | 1 | 1 | |
| <i>Actinomyces viscosus</i> | 2 | | | | 1 | | 1 |
| <i>Bifidobacterium breve</i> | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | 2 | | | 1 | | 1 | |
| <i>Propionibacterium granulosum</i> | 4 | | | 2 | 1 | 1 | |
| Gram-dodatnie pałeczki ogółem | 11 | | | 4 | 3 | 3 | 1 |
| Bakterie beztlenowe łącznie | 49 | | 4 | 17 | 12 | 12 | 4 |

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

| 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>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503 | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Porphyromonas levii</i> ATCC 29147 | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> ATCC 29943 | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25583 | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Tannerella forsythia</i> ATCC 58848 | 1 | | | | | 1 | |
| <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Finegoldia magna</i> ATCC 29328 | 1 | | | | | 1 | |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337 | 1 | | | | 1 | | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827 | 1 | | | 1 | | | |

Gram-dodatnich ziarniaków i pałeczek wynosiło ono $\leq 2,5-10,0$ mg/ml.

Opublikowane dotychczas wyniki badań innych autorów wykazały działanie olejku pichtowego na niektóre bakterie tlenowe i grzyby pleśniowe lub dermatofity. Survilienė i wsp. (11) opisali wysoką aktywność olejku wobec szczepów *Aspergillus flavus*. Trojanowska i wsp. (9) wykazali wrażliwość na olejek pichtowy dermatofitów z rodzajów *Trichophyton*, *Epidermophyton* i *Microsporum*. Kloucek i wsp. (14) udowodnili jego działanie wobec grzybów z gatunków *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* i *Penicillium digitatum* oraz brak aktywności wobec bakterii z gatunków *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* i *Pseudomonas aeruginosa*. Natomiast w badaniach

Morrisa i wsp. (13) wzrost szczepów *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* sp. i *Candida albicans* hamowały stężenia olejku wynoszące od 0,05 do $\geq 0,1$ mg/ml.

Wnioski

1. Wśród Gram-ujemnych bakterii największą wrażliwość na olejek pichtowy wykazały szczepy z gatunków *Tannerella forsythia*, *Bacteroides fragilis* i *Bacteroides uniformis*.
2. Gram-dodatnie ziarniaki beztlenowe okazały się bardziej wrażliwe niż Gram-dodatnie pałeczki.
3. Olejek pichtowy był bardziej aktywny wobec ocenianych Gram-dodatnich bakterii niż Gram-ujemnych pałeczek beztlenowych.

Piśmiennictwo

1. Klimek R. Olejki eteryczne. Wyd Przem Lekkiego i Spożywczego, Warszawa 1957; 327-30.
2. Matsubara E, Fukagawa M, Okamoto T i wsp. The essential oil of *Abies sibirica* (Pinaceae) reduces arousal levels after visual display terminal work. Flavour Fragr J 2011; 26:204-10.
3. Semerikova SA, Semerikov VL. Genetic variability of Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb.) inferred from AFLP markers. Genetica 2011; 47(2):272-8.
4. Yang XW, Li SM, Shen VH i wsp. Phytochemical and biological study of *Abies* species. Chem Biodivers 2008; 5:56-81.
5. Noreikaite A, Ayupova R, Satbayeva E i wsp. General toxicity and antifungal activity of a new dental gel with essential oil from *Abies sibirica* L. Med Sci Monit 2017; 23:521-7.
6. Kommission E. Monographie Pini aeroleum/ Kiefernadelöl – Berichtigung B Anz. No 50 of 13.03.1990.
7. Kamin W, Kieser M. Pinimenthol ointment in patients suffering from upper respiratory tract infections – A postmarketing observational study. Phytomed 2007; 14:787-91.
8. Khassanov VV, Ryzhova GL, Kuriaeva TT i wsp. Investigation of content and antioxidant capacity of steam distillations of siberian Pine Tree (*Abies sibirica* Ledeb). Chem of Plant Raw Material 2009; 4:83-8.
9. Trojanowska D, Tokarczyk M, Bogusz B i wsp. Ocena *in vitro* aktywności przeciwgrzybiczej olejku pichtowego wobec dermatofitów. Mikologia 2010; 17(4):229-32.
10. Głowacka A, Wittek N, Bednarek-Gejo A. Ocena wpływu olejku pichtowego na aktywność enzymów hydrolitycznych wybranych szczepów *Candida albicans*. Mikologia 2009; 16(4):220-3.
11. Survilienė E, Valiūskaitė A, Snieškienė V i wsp. Effect of essential oils on fungi isolated from apple and vegetables. Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. Sodininkyste ir Daržininkyste 2009; 28(3):227-34.
12. Ayupova R, Masteiková R, Nejezchlebová M i wsp. Preparation and evaluation of the oral gel containing the essential oil from Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb). Česka Slov Farm 2014; 63(3):113-9.
13. Morris JA, Khettry A, Seitz EW. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J Am Oil Chem Soc 1979; 56:595-603.
14. Kloucek P, Smid J, Frankova A i wsp. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. Food Res Intern 2011; 5:1-5.
15. Bojarczuk A, Skibiński R, Komsta Ł. Multivariate analysis of UV spectra of complex herbal mixtures and essential oils. Ann Univer Mariae Curie-Skłodowska. Lublin 2009; 22:69-73.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 10.12.2018

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