

*Anna Kędzia¹, Andrzej W. Kędzia²

Aktywność *in vitro* olejku świerkowego (*Oleum Picea excelsa*) wobec grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*

In vitro activity of spruce oil (*Oleum Picea excelsa*) against yeastlike fungi from genus of *Candida*

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

²Katedra Auksologii Klinicznej i Pielęgniarstwa Pediatricznego,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Katedry: dr hab. n. med. Andrzej W. Kędzia, prof. UM

SUMMARY

Introduction. Spruce (*Picea abies* L.) is a tree belonging to Pinaceae family (Pinaceous). It is large tree (to 50 m height), which produce needles and cones. Spruce essential oil, is used in medicine. Its components are following: borneol, limonene, camphora, bornyl acetate, α - and β -pinene, 3-carene, β -phellandrene, camphene and cadinene. The oil exhibited antimicrobial activity towards bacterial, viruses, yeastlike fungi and mycoses.

Aim. The aim of this study was to evaluate the activity of spruce oil on yeastlike fungi.

Material and methods. The data included 31 yeastlike fungi isolated from patients from oral cavity. The strains belonging to the genus: *Candida albicans* (15 strains), *C. glabrata* (2), *C. guilliermondii* (2), *C. humicola* (1), *C. kefyr* (2), *C. krusei* (2), *C. lusitaniae* (1), *C. parapsilosis* (3), *C. tropicalis* (2) and *C. utilis* (1). Moreover investigated 9 reference strains. The susceptibility (MIC) yeastlike fungi to spruce oil (Semifarm) was determined by plate dilutions technique in Sabouraud agar. The inoculums contained 10^5 CFU per spot. The agar plate were inoculated using the Steers replicator. Incubation of agar plates was performed in aerobic conditions, at temp. 37°C for 24-48 hours. The MIC was defined as the lowest concentrations of spruce oil completely inhibited growth of tested strains of yeastlike fungi.

Results. The results indicated, that tested strains of yeastlike fungi were susceptible to oil in concentrations 7.5- \geq 20.0 mg/ml. The growth of the strains from genus *Candida albicans* was inhibited by concentrations 7.5- \geq 20.0 mg/ml. The spruce oil was active on *Candida glabrata* strains in concentrations 10.0-20.0 mg/ml. The less sensitivity characterized the genus of *Candida lusitaniae*, *Candida utilis* (MIC = 15.0 mg/ml), *Candida krusei* and *Candida parapsilosis* (MIC 15.0- \geq 20.0 mg/ml). The oil was the lowest active towards strains of *Candida guilliermondii*, *Candida humicola*, *Candida kefyr* and *Candida tropicalis*. The growth of these strains was inhibited by concentrations 20.0 mg/ml and high.

Conclusions. The strains from genus of *Candida* were the moderate susceptible to spruce oil. The oil was the lowest active towards strains from genus *Candida guilliermondii*, *Candida humicola*, *Candida kefyr* i *Candida tropicalis*.

Keywords: yeastlike fungi, activity, spruce oil, oral cavity

STRESZCZENIE

Wstęp. Świerk pospolity (*Picea abies* L.) jest drzewem należącym do rodziny Pinaceae (Sosnowate). Jest wysokim drzewem (do 50 m wysokości), które wytwarza igły oraz szyszki. Produkowany olejek świerkowy jest wykorzystywany w lecznictwie. W jego składzie są obecne: borneol, limonen, kamfora, octan bornylu, α - i β -pinen, 3-karen, β -felandren, kamfen i kadinen. Olejek świerkowy wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii, wirusów oraz grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych.

Cel pracy. Celem badań była ocena działania olejku świerkowego na grzyby drożdżopodobne.

Materiał i metody. Badania objęły 31 grzybów drożdżopodobnych wyizolowanych z jamy ustnej pacjentów. Szczepy należały do gatunków: *Candida albicans* (15 szczepów), *C. glabrata* (2), *C. guilliermondii* (2), *C. humicola* (1), *C. kefyr* (2), *C. krusei* (2), *C. lusitaniae* (1), *C. parapsilosis* (3), *C. tropicalis* (2) i *C. utilis* (1). Ponadto zbadano 9 szczepów wzorcowych. Wrażliwość (MIC) grzybów drożdżopodobnych na olejek świerkowy oznaczano metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze Sabourauda. Inokulum zawierało 10^5 drobnoustrojów na kroplę. Zawiesinę przenoszono na płytki agarowe aparatem Steersa. Stężenia olejku wynosiły 20,0; 15,0; 10,0; 7,5 i 5,0 mg/ml. Posiewy inkubowano w warunkach tlenowych w temp. 37°C przez 24-48 godzin. MIC zostało określone jako najmniejsze stężenie olejku świerkowego, które całkowicie zahamowało wzrost szczepów grzybów drożdżopodobnych.

Wyniki. Wyniki wskazują, że badane szczepy grzybów drożdżopodobnych były wrażliwe na olejek w stężeniach 7,5- \geq 20,0 mg/ml. Wzrost szczepów z gatunku *Candida albicans* hamowały stężenia wynoszące 7,5- \geq 20,0 mg/ml. Olejek świerkowy działał w zakresie

10,0-20,0 mg/ml wobec szczepów *Candida glabrata*. Niższą wrażliwością charakteryzowały się szczepy *Candida lusitaniae* i *Candida utilis* (MIC = 15,0 mg/ml) oraz gatunki *Candida krusei* i *Candida parapsilosis* (MIC 15,0-≥ 20,0 mg/ml). Olejek był najmniej aktywny wobec szczepów *Candida guilliermondii*, *C. humicola*, *C. kefyr* i *C. tropicalis*. Wzrost tych szczepów był hamowany przez stężenia wynoszące 20,0 mg/ml i wyższe.

Wnioski. Szczepy z rodzaju *Candida* były średnio wrażliwe na olejek świerkowy. Olejek był najmniej aktywny wobec szczepów z gatunków *Candida guilliermondii*, *C. humicola*, *C. kefyr* i *C. tropicalis*.

Słowa kluczowe: grzyby drożdżopodobne, działanie, olejek świerkowy, jama ustna

Wstęp

Świerk pospolity (*Picea abies* L.) jest drzewem należącym do rodziny *Pinaceae* (Sosnowate). Występuje w Norwegii, Alpach, na Bałkanach, we wschodnim Uralu, a także w Ameryce Północnej. Rośnie na obszarach górskich i pogórzu. Może osiągać wysokość powyżej 50 m. Jest drzewem długowiecznym (do 200 lat i dłużej). Wymaga gliniastopiaszczystej gleby, odpowiedniej wilgotności i czystego środowiska. Wytwarza krótkie igły, długości 1-3 cm oraz długie, do 10-15 cm szyszki, w kształcie cygar, pokryte zaokrąglonymi drobno ząbkowanymi łuskami, które są początkowo barwy zielonej, a potem brązowo-szarej. Ze świerkiem wiąże się też pewna tradycja. Z Oslo, stolicy kraju Norwegii, każdego roku przed świętami Bożego Narodzenia odpowiedniej wysokości świerki wysyłane są do Londynu, Waszyngtonu i Nowego Yorku, jako forma podziękowania za pomoc, jaką wymienione kraje udzieliły Norwegii w czasie II wojny światowej. Tradycyjnie, co roku wysokie świerki ustawiane są na placach w stolicach i różnych miastach wielu krajów na świecie.

Drewno świerkowe jest wykorzystywane w przemyśle drzewnym, papierniczym, górnictwie, hutnictwie i innych gałęziach przemysłu oraz jako drzewo ozdobne (1-3). Natomiast nasiona stanowią pożywienie niektórych zwierząt leśnych (wiewiórek, ryjówek) oraz kilku gatunków ptaków. W lecznictwie wykorzystuje się igły oraz pędy świerkowe. Z nich przygotowuje się odwary, wyciągi i syropy stosowane w zapaleniu dróg oddechowych, jamy ustnej, bólach reumatycznych, stawowych i mięśniowych, jako środki napotne, odnawiające, ściągające, moczopędne oraz wzmagające wydzielanie soków trawiennych (4, 5). Igły świerkowe używane są do kąpieli i inhalacji.

Doświadczenia wykazały, że skład chemiczny wytwarzanego przez świerk olejku eterycznego zależy od miejsca, w którym drzewo rośnie (6-13). Wśród głównych związków obecnych w olejku są m.in.: borneol, limonen, kamfora, octan bornylu, α - i β -pinen, 3-karen, β -felandren i kamfen (6-8). Badania wskazują, że wyciągi z igieł świerkowych, olejek eteryczny oraz niektóre jego składniki działają przeciwdrobnoustrojowo (1, 3, 6, 8, 13-19).

W niewielu publikacjach opisano przeciugrzybicze działanie olejku świerkowego.

Cel pracy

Oznaczenie wrażliwości na olejek świerkowy grzybów drożdżopodobnych wyhodowanych z jamy ustnej pacjentów.

Materiał i metody badań

Badane szczepy wyizolowane z jamy ustnej pacjentów zostały zidentyfikowane do gatunków: *Candida albicans* (15 szczepów), *C. glabrata* (2), *C. guilliermondii* (2), *C. humicola* (1), *C. kefyr* (2), *C. krusei* (2), *C. lusitaniae* (1), *C. parapsilosis* (3), *C. tropicalis* (2) i *C. utilis* (1). Doświadczenia objęły też następujące szczepy wzorcowe z gatunków: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 66032, *C. guilliermondii* ATCC 6260, *C. kefyr* ATCC 4130, *C. krusei* ATCC 14249, *C. lusitaniae* ATCC 34499, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750 i *C. utilis* ATCC 9958. Oznaczono wrażliwość wymienionych grzybów drożdżopodobnych metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze Sabourauda. Użyty olejek świerkowy (Semifarm) najpierw rozpuszczono w DMSO (Serva). Dalsze rozcieńczenia były wykonywane w jałowej wodzie destylowanej do uzyskania stężeń wynoszących 20,0, 15,0, 10,0, 7,5 i 5,0 mg/ml. Użyta hodowla zawierała 10^5 drobnoustrojów na kroplę i była przenoszona aparatem Steersa na powierzchnię agaru Sabourauda zawierającego odpowiednie stężenia olejku lub bez olejku (kontrola wzrostu szczepów). Hodowlę podłoży z posiewami i kontrolnych prowadzono przez 24-48 godz. w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C. Za najmniejsze stężenie hamujące (MIC) uznano takie, które całkowicie hamowało wzrost szczepów grzybów drożdżopodobnych.

Wyniki i dyskusja

W tabeli 1 zostały zamieszczone wyniki wrażliwości na olejek świerkowy grzybów drożdżopodobnych wyhodowanych od pacjentów, a w tabeli 2 wybranych szczepów wzorcowych. Wzrost badanych szczepów grzybów drożdżopodobnych był hamowany w stężeniach

Tab. 1. Wrażliwość grzybów drożdżopodobnych na olejek świerkowy

Grzyby drożdżopodobne	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)				
		≥ 20,0	15,0	10,0	7,5	5,0
<i>Candida albicans</i>	15	7	4	2	2	
<i>Candida glabrata</i>	2	1		1		
<i>Candida guilliermondii</i>	2	2				
<i>Candida humicola</i>	1	1				
<i>Candida kefyr</i>	2	2				
<i>Candida krusei</i>	2	1	1			
<i>Candida lusitaniae</i>	1		1			
<i>Candida parapsilosis</i>	3	2	1			
<i>Candida tropicalis</i>	2	2				
<i>Candida utilis</i>	1		1			
Ogółem	31	18	8	3	2	

Tab. 2. Wrażliwość szczepów wzorcowych grzybów drożdżopodobnych na olejek świerkowy

Grzyby drożdżopodobne	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)				
		≥ 20,0	15,0	10,0	7,5	5,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	1				
<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	1	1				
<i>Candida guilliermondii</i> ATCC 6260	1	1				
<i>Candida kefyr</i> ATCC 4130	1	1				
<i>Candida krusei</i> ATCC 14249	1		1			
<i>Candida lusitaniae</i> ATCC 34499	1		1			
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1		1			
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	1		1			
<i>Candida utilis</i> ATCC 9958	1		1			

7,5-20,0 mg/ml lub wyższych. Wśród gatunku *Candida albicans* tylko 4 szczepy były wrażliwe na niższe stężenia, wynoszące 7,5-10,0 mg/ml. Olejek świerkowy był aktywny w zakresie 10,0-20,0 mg/ml wobec szczepów *Candida glabrata*. Niższą wrażliwością charakteryzowały się szczepy *Candida lusitaniae* i *Candida utilis* (MIC = 15,0 mg/ml) oraz gatunki *Candida krusei* i *Candida parapsilosis* (MIC 15,0-≥ 20,0 mg/ml).

Olejek wykazał najniższą aktywność wobec szczepów z gatunków *Candida guilliermondii*, *Candida humicola*, *Candida kefyr* i *Candida tropicalis*. Wzrost wymienionych szczepów był hamowany przez stężenia wynoszące 20,0 mg/ml i wyższe.

Wyniki szeregu badań przeprowadzonych przez innych autorów także wskazują na przeciwdrobnoustrojową aktywność olejku świerkowego (1, 3, 6,

8, 10-20). Tanase i wsp. (3) opisali działanie ekstraktów świerkowych na szczepy *Escherichia coli*. Wyniki kolejnych autorów wskazują na aktywność wobec niektórych Gram-dodatnich bakterii oraz Gram-ujemnych pałeczek (szczególnie z gatunku *Proteus vulgaris*). W tych badaniach szczepy Gram-ujemnych pałeczek *Klebsiella pneumoniae* były wrażliwe na stężenia olejków w zakresie 3,5-13,0 mg/ml (17). Thielmann i wsp. (14) metodą seryjnych rozcieńczeń (MIC) udowodnili aktywność olejku wobec szczepów *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, a Surviliene i wsp. (15) działanie na szczepy *Aspergillus flavus* i *A. flavus* var. *oryzae*. Kolejni badacze (8) wykorzystując metodę krążkowo-dyfuzyjną, uzyskali strefy zahamowania wzrostu szczepów *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* oraz wykazali

brak działania wobec szczepów z gatunków *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Rhizopus nigricans*.

W przypadku ocenianych przez nas grzybów, szczepy z rodzaju *Candida* okazały się wrażliwe na olejek świerkowy w zakresie stężeń od 7,5 do 20,0 mg/ml. Jedynie 16% szczepów wymagało do zahamowania wzrostu użycia olejku eterycznego w stężeniach powyżej 20,0 mg/ml.

Wnioski

1. Szczepy z rodzaju *Candida* były średnio wrażliwe na olejek świerkowy.
2. Olejek świerkowy był najmniej aktywny wobec szczepów z gatunków *Candida guilliermondii*, *Candida humicola*, *Candida kefyr* i *Candida tropicalis*.

Piśmiennictwo

1. Salem MZM, Elansary HO, Elkelish AA i wsp. *In vitro* bioactivity and antimicrobial activity of *Picea abies* and *Larax decidua* wood and bark extracts. *Bio Resources* 2016; 11(4):9421-37.
2. Cope JA, Winch FF, Cope FA. Known your trees. Cornell University Media and Technology Service Resource Center. Ithaca NY USA.
3. Tanase C, Boz J, Orojan S i wsp. Antibacterial activity of spruce bark (*Picea abies* L.) extract against *Escherichia coli*. *Acta Biol Marisliensis* 2018; 1(1):5-9.
4. Gack P. Moje drzewa; http://drzewa.NI4.Hetmark.Pl/atlas/świerk/świerk_pospolity. 2006-2018.
5. Lamer-Zarawska E. Profilaktyka schorzeń infekcyjnych układu oddechowego u dzieci. *Panacea* 2007; 1(18):12-5.
6. Radulescu V, Savine C, Chifirine C i wsp. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from shoots spruce (*Picea abies* L.). *Rev Chim (Bucharesti)* 2011; 62(1):69-74.
7. Pauli A, Schilcher H. Specific selection of essential oil compounds from treatment of children's infection disease. *Pharmaceut* 2004; 1:1-30.
8. Bharat CS, Parveen D. Evaluation of *in vitro* antimicrobial potential and phytochemical analysis of spruce, cajeput and jamrosa essential oil against clinical isolates. *Int J Green Pharm* 2016; 10(1):27-32.
9. Salem MZM, Zeidler A, Bóhm M i wsp. OC/MS analysis of oil extractives from wood and bark of *Pinus silvestris*, *Abies alba*, *Picea abies*, and *Larix deciduas*. *Bio Resources* 2015; 10(4):7723-37.
10. Grassman J, Hippeli S, Vollmann R i wsp. Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. *Agric Food Chem* 2003; 51(26):7576-82.
11. Tumen I, Hafizogu H, Kilic A i wsp. Yields and constituents of essential oil from cones of *Pinaceae* spp. natively growth in Turkey. *Molecules* 2010; 15(8):5797-806.
12. Bier MCJ, Medeiros ABP, de Oliveira JS i wsp. Liquifield gas extraction: A new method for the recovery of terpenoids from agroindustrial and forest wastes. *J Superit Fluids* 2016; 110:97-102.
13. Salem MZM, Zeidan YE, Mansour MM i wsp. Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mould fungi. *Int Biodeterior Biodegrad* 2016; 106:88-96.
14. Thielmann J, Muranyl P, Kazman P. Screening essential oil for their antimicrobial activities against foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Helvion* 2019; 5(6):e01860.
15. Surviliene E, Valiūškaite A, Snieškienė V. Effect of essential oils on fungi isolated from apple and vegetables. *Sci Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture Sodininkyste IR Daržininkyste* 2009; 28(3).
16. Kozłowski G, Metraux J-P. Antifungal properties of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedling homogenates. *Acta Soc Botanic Polon* 1999; 68(3):191-5.
17. Kalemba D, Kunucka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 2003; 10:813-29.
18. Minowa S, Sėskena R, Voitkāne S i wsp. Impact of pine (*Pinus silvestris* L.) and spruce (*Pinus abies* (L.) Karst) bark extracts on important streawberry pathogens. *Proc Latv Acad Sci Sect B Nat Extract Appl Sci* 2015; 69(1-2):62-7.
19. Tanase C, Cosarca S, Toma F i wsp. Antibacterial activities of spruce bark (*Picea abies* L.) extract and its components against human pathogens. *Rev Chim* 2018; 69(6).
20. Raurio 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.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

otrzymano/received: 03.12.2019

zaakceptowano/accepted: 10.01.2020

Adres/address:

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