

*Małgorzata Gniewosz, Agata Stobnicka, Ewa Adamska*

PORÓWNANIE DZIAŁANIA PRZECIWDROBNOUSTROJOWEGO  
OLEJKÓW ETERYCZNYCH  
MANUKA (*Leptospermum scoparium*)  
I KANUKA (*Kunzea ericoides*)

Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Nauk o Żywności  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: dr hab. S. Błażejczak, prof. SGGW

*Określono minimalne stężenie hamujące (MIC) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) i grzybobójcze (MFC) dwóch olejków eterycznych: manuka i kanuka w stosunku do czterech szczepów bakteryjnych: Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella Enteritidis i Bacillus subtilis, dwóch szczepów pleśni: Penicillium expansum i Aspergillus niger oraz dwóch szczepów drożdży: Saccharomyces cerevisiae i Candida krusei. Olejki eteryczne manuka i kanuka wykazały odmienną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Skuteczniejsze działanie przeciwbakteryjne wykazał olejek manuka. MIC olejku w stosunku do S. aureus wynosiło 0,31 mg/cm<sup>3</sup>, a B. subtilis 0,63 mg/cm<sup>3</sup>. Bakterie Gram-ujemne były mniej wrażliwe na działanie olejku manuka, ponieważ MIC kształtowało się na poziomie 10 mg/cm<sup>3</sup>. W stosunku do grzybów olejek manuka cechował się niską aktywnością fungistatyczną oraz brakiem właściwości grzybobójczych w badanym zakresie stężeń. Olejek kanuka wykazywał słabsze działanie hamujące i bakteriobójcze niż olejek manuka. Bardziej wrażliwymi szczepami bakteryjnymi na ten olejek były bakterie Gram-dodatnie (S. aureus i B. subtilis). Olejek ten charakteryzował się większą fungistatyczną aktywnością wobec pleśni A. niger niż olejek manuka.*

Hasła kluczowe: MIC, MBC, MFC, olejki eteryczne  
Key words: MIC, MBC, MFC, essential oils

Zainteresowanie związkami chemicznymi naturalnego pochodzenia i o działaniu przeciwdrobnoustrojowym przyczynia się do coraz częstsze go prowadzenia badań w tym zakresie. Olejki eteryczne są aromatycznymi oleistymi cieczami otrzymywanymi z materiału roślinnego. Pod względem składu chemicznego są one złożonymi, wieloskładnikowymi mieszaninami terpenów i terpenoidów (1,2).

Olejki manuka i kanuka pozyskuje się z roślin pochodzących z Nowej Zelandii i Australii. Otrzymywane są z liści i gałązek roślin należących do rodziny mirtowatych (*Myrtaceae*), endemicznych na tych obszarach niewielkich drzew i krzewów z gatunków *Leptospermum scoparium* (manuka) i *Kunzea ericoides* (kanuka) (3).

Olejki manuka i kanuka zawierają około 100 różnych składników. Głównymi składnikami olejku manuka są seskwiterpeny (60% do 70%) i monoterpeny (ok. 3%). Zawartość utlenionych węglowodorów i triketonów (leptospermon i flaweson) wynosi około 30% (4,5,6).

Olejek kanuka charakteryzuje się wysoką zawartością monoterpenów, głównie  $\alpha$ -pinenu, p-cymenu, 1,8-cyneolu,  $\gamma$ -terpinenu oraz niższymi zawartościami seskwiterpenów (wiridiflorol, kalamenen, ledol i wiridifloren). Jest on produkowany komercyjnie, ale uważa się, iż wykazuje niższą aktywność przeciwdrobnoustrojową (7).

Zastosowanie powyższych roślin w tradycyjnej medycynie przeciwko schorzeniom typu zapalnego i bakteryjnego wskazuje na ich prawdopodobne działanie przeciwdrobnoustrojowe, dlatego zasadne było podjęcie badań w tym zakresie. Celem badań było określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) i grzybobójczego (MFC) olejków eterycznych manuka i kanuka w stosunku do wybranych szczepów drobnoustrojów.

## MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano szczepy bakterii: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 oraz *Bacillus subtilis* ATCC 6633, szczepy pleśni: *Penicillium expansum* ATCC 7861, *Aspergillus niger* ATCC 9142 oraz szczepy drożdży: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Candida krusei* ATCC 14243. Do badań użyto handlowe olejki eteryczne marki dr Beta (Pollena Aroma Warszawa): olejek manuka (*Leptospermum scoparium*) i olejek kanuka (*Kunzea ericoides*). Olejki przechowywane były w temperaturze 4°C, w butelkach z ciemnego szkła.

Gęstość użytego inokulum bakteryjnego wynosiła  $1,0 \times 10^7$  j.t.k./cm<sup>3</sup>, a inokulum pleśni i drożdży  $1,0 \times 10^6$  j.t.k./cm<sup>3</sup>. Dla każdego szczepu oznaczono minimalne stężenie hamujące [g/cm<sup>3</sup>] (MIC, ang. Minimal Inhibitory Concentration) i minimalne stężenie bakteriobójcze [g/cm<sup>3</sup>] (MBC, ang. Minimal Bactericidal Concentration) oraz minimalne stężenie grzybobójcze [g/cm<sup>3</sup>] (MFC, ang. Minimal Fungicidal Concentration). MIC olejków w stosunku do bakterii oznaczono metodą makrorozcieńczeń na podłożu płynnym Mueller-Hinton (Merck, Niemcy), MBC oznaczono metodą płytkową na podłożu stałym Mueller-Hinton Agar (BTL, Polska), natomiast MIC wobec grzybów oznaczono metodą makrorozcieńczeń na podłożu płynnym Sabouraud (BTL, Polska), a MFC oznaczono metodą płytkową na podłożu stałym Sabouraud (BTL, Polska). Dla metody makrorozcieńczeń zastosowano podwójny test szeregowy oraz kontrolę negatywną. Dla metody płytkowej wykonano posiewy w dwóch powtórzeniach z każdej próby. Powyższa metodyka jest zgodna ze standardami NCCLS (8).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań dotyczących minimalnego stężenia hamującego oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego i grzybobójczego badanych olejków eterycznych w stosunku do szczepów testowych przedstawiono w tab.I i tab.II.

Tab e l a I. Wyniki działania przeciwdrobnoustrojowego olejków manuka i kanuka (MIC, MBC) na badane szczepy bakterii

Table I. Results of antibacterial activity of manuka and kanuka oils (MIC, MBC) on tested bacteria strains

| Szczep                           | Olejek manuka      |      | Olejek kanuka |     |
|----------------------------------|--------------------|------|---------------|-----|
|                                  | MIC                | MBC  | MIC           | MBC |
|                                  | mg/cm <sup>3</sup> |      |               |     |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923      | 0,31               | 1,25 | 2,5           | 10  |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633     | 0,63               | 0,63 | 2,5           | 80  |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922        | 10                 | 80   | 40            | 80  |
| <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 | 10                 | 40   | 40            | 40  |

Tab e l a II. Wyniki działania przeciwdrobnoustrojowego olejków manuka i kanuka (MIC, MFC) na badane szczepy grzybów

Table II. Results of antifungal activity of manuka and kanuka oils (MIC, MFC) on tested fungi strains

| Szczep                         | Olejek manuka      |     | Olejek kanuka |     |
|--------------------------------|--------------------|-----|---------------|-----|
|                                | MIC                | MFC | MIC           | MFC |
|                                | mg/cm <sup>3</sup> |     |               |     |
| <i>C. krusei</i> ATCC 14243    | >80                | >80 | >80           | >80 |
| <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 | 80                 | >80 | >80           | >80 |
| <i>A. niger</i> ATCC 9142      | 80                 | >80 | >80           | >80 |
| <i>P. expansum</i> ATCC 7861   | 80                 | >80 | 20            | 40  |

Olejek manuka wykazał się silnym działaniem hamującym wzrost bakterii G(+), natomiast ten sam efekt wobec G(-) wywoływał przy znacznie wyższym stężeniu (tab. I). Podobnie kształtowała się aktywność bakteriobójcza, która była większa w stosunku do bakterii G(+). Różnice w aktywności olejku wobec tych dwóch grup bakterii mogą być spowodowane odmienną budową ich komórek. W ścianie komórkowej bakterii G(-) występuje zewnętrzna błona zbudowana z hydrofilowych lipopolisacharydów uniemożliwiających lipofilowym składnikom olejku na dyfuzję do wnętrza komórki (9,10). Stąd na bakterie G(-) silniej działają małe cząsteczki o wyższej hydrofilowości, mogące przedostawać się do komórki poprzez poryny. Olejek manuka ujawnił również bakteriobójcze działanie przy niskim stężeniu wobec przetrwalnikujących bakterii G(+) *B. subtilis* ATCC 6633 (MBC=0,63 mg/cm<sup>3</sup>), co mogło być spowodowane zdolnością składników olejku do hamowania kiełkowania przetrwalników bakteryjnych (11).

W stosunku do grzybów olejek manuka cechował się niską aktywnością fungistatyczną oraz brakiem właściwości grzybobójczych w badanym zakresie stężeń (MFC > 80 mg/cm<sup>3</sup> dla wszystkich grzybów testowych). Wobec trzech badanych szczepów zahamowanie rozwoju grzybni następowało przy stężeniu 80 mg/cm<sup>3</sup>, zaś wobec drożdży *C. krusei* ATCC 14243 olejek nie wykazywał aktywności fungistatycznej w badanym zakresie stężeń.

Wcześniejsze badania olejku manuka potwierdzają jego wysoką skuteczność wobec bakterii G(+), dla których wartości MIC nie przekraczały 0,12% (1,2 mg/cm<sup>3</sup>). Zbliżone wyniki aktywności tego olejku wobec ziarniaków z gatunku *S. aureus* odnotowali Holderna-Kędzia i wsp. (12), gdyż zahamowanie wzrostu następowało przy 0,25 mg/cm<sup>3</sup>. W stosunku do G(-) pałeczek *E. coli* uzyskano jednak dwukrotnie niższą wartość MIC (5 mg/cm<sup>3</sup>), również testowane przez badaczy szczepy grzybowe wykazywały większą wrażliwość na ten olejek. Wzrost drożdży *C. krusei* hamowany był przy stężeniu 5 mg/cm<sup>3</sup>, zaś rozwój pleśni *A. niger* przy stężeniu 7,5 mg/cm<sup>3</sup>, podczas gdy użyte w doświadczeniu szczepy tych samych gatunków wykazały oporność nawet przy dziesięciokrotnie wyższych stężeniach olejku. Inne doniesienia wskazują na brak aktywności przeciwwgrzybiczej olejku manuka w stosunku do drożdży i pleśni, co zgadza się z ujawnionymi w toku doświadczenia wynikami. Takie różnice co do spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej charakterystyczne są dla olejków o dużej zmienności składu. Wśród roślin z gatunku manuka wyodrębniono cztery chemotypy, z których tylko jedna grupa zawiera wysokie stężenia triketonów (leptospermonu i jego pochodnych) odpowiedzialnych za właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku manuka. Badany olejek mógł więc zostać otrzymany z roślin należących do innego chemotypu lub o niższej zawartości tych składników aktywnych, co tłumaczy jego mniejsze spektrum działania wobec drobnoustrojów.

Na podstawie wyników MIC i MBC olejku kanuka wykazano, że charakteryzował się mniejszą aktywnością bakteriostatyczną i bakteriobójczą niż badany olejek manuka. Choć jego działanie na bakterie G(+) było silniejsze niż na G(-), to wartości MIC i MBC były kilkakrotnie większe od wartości MIC i MBC olejku kanuka wobec tych samych szczepów testowych (Tab. I).

Olejek kanuka charakteryzował się również wybiórczą aktywnością w stosunku do badanych szczepów grzybów – aktywność ta obejmowała jedynie pleśnie, a nie ujawniła się wobec drożdży (Tab. II). Najsilniej olejek hamował wzrost *P. expansum* ATCC 7861 (MIC=20 mg/cm<sup>3</sup>), jak również powodował efekt letalny przy stężeniu 40 mg/cm<sup>3</sup>. Nie wykazywał on jednak aktywności grzybobójczej wobec drugiej z pleśni (*A. niger* ATCC 9142), również oba testowe szczepy drożdżowe okazały się niewrażliwe na olejek w badanym zakresie jego stężeń.

W literaturze niewiele jest doniesień na temat potencjału przeciwdrobnoustrojowego olejku kanuka, przeprowadzono jedynie wstępne badania metodą dyfuzyjno-krążkową. Wyniki ukazały aktywność tego olejku zastosowanego w ilości 10 µl/krążek w stosunku do ziarniaków z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus* oraz drożdży z rodzaju *Candida* (13,14). Inne badania wskazują, iż olejek działał wobec G(+) bakterii w zakresie stężeń 2-4 mg/cm<sup>3</sup>, nie wykazywał natomiast aktywności w stosunku do drożdży, co jest zgodne z uzyskanymi wynikami doświadczenia. Badacze twierdzą, iż niska aktywność olejku kanuka może być związana z dużą

zawartością cyklicznych węglowodorów (głównie  $\alpha$ -pinenu), które wykazują stosunkowo niską aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu z fenolami czy alkoholami terpenowymi. W badaniach *Dorman* i *Deans* (15)  $\alpha$ -pinen wykazał średnią aktywność przeciwbakteryjną, w ilości 15  $\mu$ l działając na 13 z 25 badanych gatunków bakterii.

## WNIOSKI

1. Olejek manuka wykazuje się skuteczniejszym niż olejek kanuka działaniem hamującym i bójczym, zarówno stosunku do bakterii G(+), jak i bakterii G(-).
2. Olejki nie wykazują istotnego działania fungistatycznego i grzybobójczego.
3. Szczepem bakteryjnym o największej wrażliwości w stosunku do olejku manuka był szczep *B. subtilis* ATCC 6633, a w stosunku do olejku kanuka *S. aureus* ATCC 25923 .
4. Spośród szczepów grzybowych, jedynie *A. niger* ATCC 9142 wykazał wrażliwość na hamujące wzrost działanie olejku kanuka.

M. Gniewosz, A. Stobnicka, E. Adamska

## COMPARISON OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MANUKA (*Leptospermum scoparium*) AND KANUKA (*Kunzea ericoides*) ESSENTIAL OILS

### Summary

Defined the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimal fungicidal concentration manuka and kanuka essential oils against four bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* and *Bacillus subtilis*, two molds strains: *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* and two yeasts strains: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*. Essential oils kanuka and manuka showed different antimicrobial activity. Manuka oil had more effective antimicrobial properties than kanuka oil. MIC of manuka oil for *S. aureus* was observed at level of 0.31 mg/cm<sup>3</sup>, and for *B. subtilis* 0.63 mg/cm<sup>3</sup>. Gram-negative bacteria were less sensitive to manuka oil, because the MIC was observed at level of 10 mg/cm<sup>3</sup>. In relation to the fungi manuka oil showed low activity and lack of fungistatic and antifungal properties in the studied concentration range. Kanuka oil showed weaker inhibitory and bactericidal activity than the manuka oil. A more sensitive bacterial strains on kanuka oil were Gram- positive bacteria (*S. aureus* and *B. subtilis*). This oil showed stronger fungistatic activity against *A. niger* than manuka oil.

## PIŚMIENNICTWO

1. Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S.: In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement Alternat Med, 2006; 6 (10): 39-44. - 2. Edris A. E.: Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytotherapy Res, 2007; 21 (4): 308-323. - 3. Douglas M., Anderson R., van Klink J., Perry N., Smallfield B: Defining North Island manuka chemotype resources. Crop Food Res Rep, 2001; 447 (2): 322-328. - 4. Maddocks-Jennings W., Wilkinson J. M., Shillington D., Cavanagh H.: A fresh look at manuka and kanuka Essentials oils from New Zealand. Int J Aromather, 2005; 15 (4): 141-146. - 5. Porter N., Wilkins A. L.: Chemical,

physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. *Phytochem*, 1998; 50 (9): 407-415. - 6. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA.: Antifungal agents and susceptibility testing. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: ASM Press, 1995. - 7. Burt S.: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review, *J Food Microbiol*, 1998; 94 (4): 223–253. - 8. Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T.: Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using the modified dilution assay method. *J Inf Chemother*, 2001; 7 (11): 251-254. - 9. Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T.: Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother*, 2001; 47 (6): 565-573. - 10. Russell A.D.: Bacterial Spores and Chemical Sporicidal Agents. *Clin Microbiol Rev*, 1990; 4 (5): 99-119.

11. Harkenthal M., Reichling J., Geiss H.K., Saller R.: Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil, and eucalyptus oil. *Pharmazie*, 1999; 54 (9): 460-463. - 12. Holderna-Kędzia E.: Działanie substancji olejkowych na bakterie i grzyby. *Post Fito*, 2010; 1 (4): 3-8. - 13. Jeong E., Jeon J., Kim H., Kim M., Lee H.: Antimicrobial activity of leptospermone and its derivatives against human intestinal bacteria. *Food Chem*, 2009; 115 (12): 1401-1404. - 14. Warnke P. H., Becker S. T., Podshun R., Sivananthan S., Springer I. N., Russo A. P. J., Wiltfang J., Fickenscher H., Sherry E.: The battle against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections, *J Craniomaxillofac Surg*, 2009; 37 (5): 392-397. - 15. Dorman H. J. D., Deans S. G.: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 2000; 88 (4): 308–316.

Adres: 02-776 Warszawa, Nowoursynowska 159.