

Małgorzata Gniewosz<sup>1</sup>, Karolina Kraśniewska<sup>1</sup>,  
Zenon Węglarz<sup>2</sup>, Jarosław L. Przybył<sup>2</sup>

## PORÓWNANIE PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ AKTYWNOŚCI ETANOLOWEGO I WODNEGO EKSTAKTU Z SZAŁWII LEKARSKIEJ (*Salvia officinalis* L.)

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Wydziału Nauk o Żywności  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: dr hab. S. Błażej, prof. SGGW

<sup>2</sup>Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych Wydziału Ogrodnictwa i Architektury  
Krajobrazu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: dr hab. J. Gajc-Wolska, prof. SGGW

*W pracy przedstawiono wyniki dotyczące przeciwdrobnoustrojowej aktywności etanolowego i wodnego ekstraktu z liści szalwii lekarskiej. Określono minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakterio- i grzybobójcze (MBC/MFC) ekstraktów w stosunku do szczepów testowych bakterii, drożdży i pleśni.*

*Ekstrakty z liści szalwii lekarskiej wykazały aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczną względem wszystkich badanych szczepów testowych. Szczepami o większej wrażliwości w stosunku do badanych ekstraktów były bakterie gram dodatnie *B. subtilis* ATCC 6633 i *S. aureus* ATCC 25923. Natomiast silniejsze działanie fungistatyczne ekstraktów stwierdzono względem *S. cerevisiae* i *P. expansum* ATCC 7861. Ponadto stwierdzono, że ekstrakt etanolowy w porównaniu z ekstraktem wodnym wykazał większą aktywność bakteriostatyczną oraz fungistatyczną.*

Hasła kluczowe: aktywność przeciwdrobnoustrojowa, ekstrakt z szalwii lekarskiej, MIC, MBC/MFC

Key words: antimicrobial activity, extract from *Salvia officinalis*, MIC, MBC/MFC

Ekstrakty oraz olejki eteryczne są obiecującą alternatywą konserwowania żywności. Pozyskiwane z różnych gatunków roślin mogą posiadać w swoim składzie związki o silnych właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych (1).

Szałwiię lekarską (*Salvia officinalis* L.) już w starożytnej Grecji uważano za cenny gatunek roślin leczniczych i przyprawowych. Roślina ta pochodzi ze wschodniej części basenu Morza Śródziemnego. Obecnie uprawiana jest w Europie, Azji i w Stanach Zjednoczonych (2, 3). Surowcem leczniczym są liście lub ziele szalwii, zawierające najwięcej związków czynnych m.in.: olejek eteryczny, di- i triterpeny, flawonoidy, fenolokwasy i garbniki, odpowiedzialnych za przeciwzapalne, ściągające i przeciwbakteryjne działanie szalwii (4, 5).

Udokumentowane działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne posiadają olejki eteryczne z szafwii lekarskiej. W przeprowadzonych dotychczas badaniach stwierdzono aktywność olejku względem bakterii z rodzaju: *Aeromonas*, *Bacillus*, *E. coli*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* (6, 7, 8) oraz grzybów: *Candida albicans*, *Torulopsis utilis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* (9). Ekstrakty z szafwii lekarskiej wykorzystywane są w przemyśle spożywczym jako naturalne przeciwutleniacze. Według badań odpowiednie stężenie tych naturalnych substancji może przeciwdziałać utlenianiu lipidów bądź proces ten opóźniać (10). Właściwości antyoksydacyjne są zależne przede wszystkim od obecności kwasu rozmarynowego oraz kwasu karnozolowego i jego pochodnych. Związki te w 90% są odpowiedzialne za właściwości przeciwutleniające preparatów ziołowych (11).

Dzięki zawartości substancji biologicznie czynnych szafwii może stanowić alternatywę dla chemicznych konserwantów czy przeciwutleniaczy, co sprzyja uzyskaniu produktów trwałych, bezpiecznych i równocześnie smacznych (12). Olejek szafwiowy i liście szafwii używane są do aromatyzowania produktów żywnościowych takich jak: konserwy mięsne i rybne, mięso, drób, kielbasy, sery, ostre sosy i napojów alkoholowych (wino, likiery). Szafwii jest popularną przyprawą kuchenną w Anglii, Holandii, Niemczech, a zwłaszcza w USA (stosuje się tam ocet i masło szafwiowe) (13).

Celem niniejszej pracy było określenie właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych etanolowego i wodnego ekstraktu z szafwii lekarskiej.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły liście szafwii lekarskiej zebrane w czerwcu 2010 roku z plantacji na polu doświadczalnym Katedry Roślin Warzywnych i Leczniczych w Wilanowie. Przeprowadzona została okresowa dwustopniowa ekstrakcja surowca wodą destylowaną i 96% etanolem przy stosunku surowca do rozpuszczalnika 1:5. Ekstrakcje prowadzono za pomocą półtechnicznego, prototypowego urządzenia do ekstrakcji i destylacji ziół 3EU01 przez 3 godz. w temp.  $80^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Następnie ekstrakty zagęszczano w wyparce rotacyjnej (Rotavapor R-205, Büchi), w celu odparowania rozpuszczalnika. Zastosowano następujące temperatury: łaźni grzejnej  $60^{\circ}\text{C}$ , skroplin  $40^{\circ}\text{C}$ , wody chłodzącej  $20^{\circ}\text{C}$ . Powstały roztwór ekstraktu zamrażono, a następnie liofilizowano przez 72 godz. (Labconco FreeZone 2,5) i rozdrobniono. Do badań liofilizat ekstraktu wodnego rozpuszczano w wodzie, a ekstraktu etanolowego w DMSO.

Materiał biologiczny stanowiły następujące szczepy testowe: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis fibuliger*, *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Penicillium expansum* ATCC 7861, *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145.

W doświadczeniu wyznaczono minimalne stężenie hamujące MIC (ang. Minimal Inhibitory Concentration) oraz minimalne stężenie bakterio- i grzybobójcze MBC/MFC (ang. Minimal Bactericidal/Fungicidal Concentration) badanych ekstraktów

z szalwii względem szczepów testowych. MIC ekstraktów wyznaczono metodą seryjnych makrorozcieńczeń w płynnym podłożu bulionowym Mueller-Hinton (Merck, Polska) dla bakterii oraz bulionie Sabouranda (BTL, Polska) dla grzybów. Ekstrakt zbadano w zakresie stężeń od 0,08 do 160 mg/cm<sup>3</sup>. Badane inokulum bakteryjne wynosiło 5×10<sup>5</sup> jtk/cm<sup>3</sup>, w przypadku drożdży i zarodników pleśni wynosiło 5×10<sup>4</sup> jtk/cm<sup>3</sup>. Inkubację prowadzono w następujących temperaturach – bakterie w 37°C przez 24h, grzyby w 28°C przez 48h. Najniższe stężenie, w którym nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmu stanowiło wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC). MBC/MFC wyznaczono przenosząc po 0,1 cm<sup>3</sup> hodowli na płytkę Petriego z tych próbek, w których stężenie ekstraktu zahamowało wzrost badanego drobnoustroju, a następnie zalewano podłożem Mueller-Hinton Agar (BTL, Polska) hodowle bakteryjne i podłożem Sabouraud Agar (BTL, Polska) hodowle grzybów. Inkubację prowadzono w temp. 37°C przez 24h dla bakterii i 28°C przez 48h dla grzybów. Wartością MBC/MFC określono stężenie olejku, przy którym występuje zmniejszenie liczby żywych komórek drobnoustroju o 99,9% (14,15)

### WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Ekstrakty z szalwii lekarskiej wykazały przeciwbakteryjną aktywność względem wszystkich badanych w doświadczeniu szczepów testowych (Tab.I).

Ekstrakt etanolowy wykazał silniejsze działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze w porównaniu z ekstraktem wodnym. Najbardziej wrażliwe na działanie ekstraktów okazały się bakterie Gram-dodatnie. W doświadczeniu stwierdzono, że bakteriostatyczna aktywność etanolowego ekstraktu równa była aktywności bakteriobójczej. Bakterie Gram-dodatnie *B. subtilis* ATCC 6633 i *S. aureus* ATCC 25923 hamowane były odpowiednio w stężeniu 0,156 mg/cm<sup>3</sup> i 0,625 mg/cm<sup>3</sup>. W przypadku bakterii Gram-ujemnych *E. coli* ATCC 25922 i *S. Enteritidis* ATCC 13076 stężenia hamujące były kilkakrotnie wyższe.

Ekstrakt wodny z szalwii wykazał słabsze działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze. MIC potrzebne do zahamowania bakterii gram dodatnich wynosiło 2,5 mg/cm<sup>3</sup>, z kolei działanie bakteriobójcze w przypadku tych bakterii było zróżnicowane i wynosiło 10mg/cm<sup>3</sup> względem *B. subtilis* i 5 mg/cm<sup>3</sup> względem *S. aureus*. Bakterie Gram-ujemne *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *E. coli* ATCC 25922 hamowane były w stężeniu MIC równym odpowiednio 5mg/cm<sup>3</sup> i 10 mg/cm<sup>3</sup>.

Aktywność przeciugrzybiczną ekstraktów w odniesieniu do szczepów testowych grzybów przedstawiono w tabeli II. Obserwowano słabsze działanie ekstraktów względem tej grupy drobnoustrojów.

Ekstrakt etanolowy z szalwii w stężeniu 10 mg/cm<sup>3</sup> wykazał działanie fungistatyczne w stosunku do *S. cerevisiae* i *P. expansum* ATCC 7861, zaś dwukrotnie wyższe stężenie ekstraktu o działaniu hamującym odnotowano wobec *A. niger* ATCC 9142 i *R. arrhizus* ATCC 11145. Działanie grzybobójcze w/w szczepów było zróżnicowane i mieściło się w granicach 20 – 80 mg/cm<sup>3</sup>. Najslabiej hamowany był wzrost *S. fibuliger*, dla którego działanie hamujące równe było bójczemu i wynosiło 40 mg/cm<sup>3</sup>.

Tab e l a I. Minimalne stężenie hamujące (MIC) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) wodnego i etanolowego ekstraktu z liści szalwii lekarskiej

Table I. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of water and ethanol extracts from sage leaves (*Salvia officinalis* L.)

Szczep	Etanolowy ekstrakt z szalwii		Wodny ekstrakt z szalwii	
	MIC	MBC	MIC	MBC
	mg/cm <sup>3</sup>			
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,156	0,156	2,5	10
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,625	0,625	2,5	5
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	2,5	2,5	5	10
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	5	10	10

W przypadku ekstraktu wodnego najsilniejsze działanie fungistatyczne stwierdzono względem *S. cerevisiae* (MIC=20 mg/cm<sup>3</sup>), nieco słabiej ekstrakt hamował wzrost *P. expansum* ATCC 7861, dla którego wartość MIC równa była 40 mg/cm<sup>3</sup>. Z kolei szczepy *S. fibuliger* i *A. niger* ATCC 9142 hamowane były w stężeniu równym 80 mg/cm<sup>3</sup> natomiast *R. arrhizus* ATCC 11145 w stężeniu wynoszącym 160 mg/cm<sup>3</sup>. Grzybobójcze działanie ekstraktu wodnego w stosunku do grzybów testowych wyniosło odpowiednio: 80 mg/cm<sup>3</sup> wobec *S. cerevisiae*, *S. fibuliger* i *P. expansum* ATCC 7861, 160 mg/cm<sup>3</sup> wobec *R. arrhizus* ATCC 11145, zaś wobec *A. niger* ATCC 9142 nawet maksymalne zbadane stężenie było nieskuteczne.

Tab e l a II. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC) wodnego i etanolowego ekstraktu z liści szalwii lekarskiej

Table II. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of water and ethanol extracts from sage leaves (*Salvia officinalis* L.)

Szczep	Etanolowy ekstrakt z szalwii		Wodny ekstrakt z szalwii	
	MIC	MBC	MIC	MBC
	mg/cm <sup>3</sup>			
<i>S. cerevisiae</i>	10	40	20	80
<i>S. fibuliger</i>	40	40	80	80
<i>A. niger</i> ATCC 9142	20	-	80	-
<i>P. expansum</i> ATCC 7861	10	20	40	80
<i>R. arrhizus</i> ATCC 11145	20	80	160	160

(-) brak działania bakteriobójczego w przebadanym stężeniu

W dostępnej literaturze można znaleźć badania dotyczące przeciwdrobnoustrojowych właściwości olejków z szalwii lekarskiej przeprowadzone przez Delemare i współpr. (7). Minimalne stężenia hamujące olejku z szalwii lekarskiej wynosiły 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml i 0,5 mg/ml odpowiednio dla bakterii *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*. Bakterie Gram-ujemne *E. coli*, *P. mirabilis* i *S. Typhimurium* hamowane były w wyższych stężeniach MIC wynoszących 5-10 mg/ml. W takim samym stężeniu jak w przypadku bakterii Gram-ujemnych hamowane były bakterie z rodzaju *S. aureus*. Wyższą aktywność przeciwbakteryjną

wykazał olejek z szalwii krzewiastej. Bakterie Gram-dodatnie z rodzaju *Bacillus* hamowane były w stężeniu MIC równym 0,05 mg/ml, z kolei bakterie z rodzaju *S. aureus* w stężeniu 0,2-1 mg/ml. Dla bakterii Gram-ujemnych minimalne stężenia hamujące wynosiły odpowiednio dla *E. coli*, *P. mirabilis* i *S. Typhimurium* – 5,0 mg/ml, 10 mg/ml i 1,0 mg/ml.

## WNIOSKI

1. Ekstrakty z liści szalwii lekarskiej wykazały aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczną względem wszystkim badanych szczepów testowych.
2. Skuteczniejsze działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze ekstraktów stwierdzono w stosunku do bakterii Gram-dodatnich *B. subtilis* ATCC 6633 i *S. aureus* ATCC 25923.
3. W przypadku aktywności fungistatycznej i grzybobójczej ekstrakty skuteczniej hamowały wzrost *S. cerevisiae* i *P. expansum* ATCC 7861.
4. Ekstrakt etanolowy w porównaniu z ekstraktem wodnym wykazał większą aktywność bakteriostatyczną oraz fungistatyczną.

M. Gniewosz, K. Kraśniewska, Z. Węglarz, J. L. Przybył

## THE COMPARISON OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF ETHANOLIC AND AQUEOUS EXTRACTS FROM SAGE (*Salvia officinalis* L.)

### Summary

In this study antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts from the leaves of *Salvia officinalis* L. was determined. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) of this extracts were investigated against tested bacteria, yeasts and molds. Extracts showed antimicrobial activity against all microorganisms used in the experiment. The results showed that extracts had the strongest bacteriostatic and bactericidal activity against gram-positive bacteria *B. subtilis* ATCC 6633 and *S. aureus* ATCC 25923. Moreover, extracts showed antifungal activity against *S. cerevisiae* and *P. expansum* ATCC 7861. The ethanolic extracts exhibited stronger activity and broader spectrum of action than aqueous extracts.

## PIŚMIENNICTWO

1. Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., Cliver D. O.: Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 2010; 21: 1199-1218. – 2. Witchl M.: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals W. M. (ed.), Medpharm USA, 2004: 84-85. – 3. Van Wyk B. E., Wink M.: Rośliny lecznicze świata, MedPharm Polska, 2004: 283. – 4. Woźniak M. Ostrowska K., Szymański L., Wybieralska K., Zieliński R.: Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktów szalwii i rozmarynu, Żywność. Nauk. Technologia. Jakość, 2009; 4(65): 133-141. – 5. Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N.: Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*, Phytochemistry, 2001; 58: 1171-1175. – 6. Marino M., Bersani C., Comi G.: Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*, International Journal of Food Microbiology, 2001; 67: 187-195. – 7. Delamare A. P. L., Moschen-Pistorello I. T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S.: Antimicrobial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil, Food Chemistry, 2007; 100(2): 603-608. – 8. Hayouni E., Chraief I., Abedrabba

*M., Bouix M., Leveau J-Y, Mohammed H., Hamdi M.*: Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical composition and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat, *International Journal of Food Microbiology*, 2008; 125: 242-251. – 9. *Hili P., Evans C. S., Veness R. G.*: Antimicrobial action of essential oils, *Letters in Applied Microbiology*, 1997; 24: 269-275. – 10. *Grzegorzczak I., Kuźma Ł., Wysokińska H.*: Związki o właściwościach przeciwtulenających w roślinach z rodzaju *Salvia*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2004; 37(3): 209-216.

11. *Cuvelier M. E., Berset C., Richard H.*: Antioxidative activity and phenolic composition of pilot plants and commercial extracts of sage and rosmery, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996; 73(5): 645-652. – 12. *Djeddi S., Bouchenah N., Setter I., Skaltsa H. D.*: Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Algeria, *Chem. of Natural Comp*, 2007; 43: 487-490. – 13. *Szczyglewska D.*: Szałwia lekarska-roślina lecznicza, *Wiadomości Zielarskie*, 1999; 41(1): 8-9. – 14. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. CLSI documents M07-A8, M26-AE, M27-A3. – 15. *Tamokou J. D. D., Tala M. F., Wabo H. K., Kuate J. R., Tane P.*: Antimicrobial activities of methanol extracts and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *J of Ethnopharm.*, 2009; 124: 571-575.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159.

Pracę zrealizowano w ramach projektu badawczego MNiSzW Nr N N312 06803