

Elżbieta Hać-Szymańczuk, Joanna Roman, Katarzyna Bednarczyk

OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ OLEJKU
ETERYCZNEGO, WYCIĄGU WODNEGO ORAZ PREPARATU
HANDLOWEGO Z ROZMARYNU LEKARSKIEGO
(*ROSMARINUS OFFICINALIS*)

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

*Tematem niniejszej pracy było zbadanie aktywności przeciwbakteryjnej olejku eterycznego, ekstraktu wodnego oraz preparatu handlowego z rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*) w stosunku do wybranych szczepów bakterii. Efektywność działania była związana z rodzajem wyciągu oraz zależała od badanego szczepu bakterii. Spośród badanych bakterii, szczepy gramodatnie były bardziej wrażliwe na działanie wyciągów z rozmarynu niż szczepy gramujemne.*

Hasła kluczowe: aktywność przeciwbakteryjna, *Rosmarinus officinalis*, zahamowanie wzrostu.

Key words: antibacterial activity, *Rosmarinus officinalis*, inhibitory effect.

Od zarania dziejów rośliny zielarskie stanowiły cenne źródło pozyskiwania dodatków przyprawowych. Ich rola nie sprowadza się tylko do poprawy smaku oraz aromatu pokarmów, bowiem niektóre spowalniają utlenianie tłuszczów lub hamują rozwój mikroorganizmów w produktach spożywczych (1).

Rozmaryn lekarski (*Rosmarinus officinalis*) jest jedną z wielu roślin zielarskich wykorzystywanych w produkcji przypraw. Surowiec zawiera między innymi: olejki lotne (w ilości 1,5–2,5%), garbniki, flawonoidy, trójterpeny, gorycze, saponiny, żywice, fitosterole, kwas rozmarynowy i wiele innych. Podstawowymi składnikami olejku eterycznego, który odpowiada za silny, kamforowy zapach rozmarynu są: kamfora (14,5%), cineol (12%), borneol (10,5%), pinen (8,5%) oraz kamfen (7%). Dzięki zawartości substancji biologicznie czynnych rozmaryn może stanowić alternatywę dla chemicznych konserwantów czy przeciwutleniaczy, co sprzyja uzyskaniu produktów trwałych, bezpiecznych i równocześnie smacznych (2, 3, 4).

Celem pracy było określenie aktywności przeciwbakteryjnej olejku eterycznego otrzymanego ze świeżych liści rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*), wyciągu wodnego z suszonego rozmarynu i preparatu handlowego w stosunku do wybranych szczepów bakterii, mogących znajdować się w żywności pochodzenia zwierzęcego.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań był olejek eteryczny (n=3), wyciąg wodny (n=3) oraz preparat handlowy (n=3) z rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*).

W celu ekstrakcji olejku eterycznego, świeże liście rozmarynu rozdrabniano, przenoszono do kolby okrągłodennej, zalewano wodą i całość destylowano w aparacie do otrzymywania olejków eterycznych wg *Derynga* firmy Simax (5). Ochłodzony destylat czterokrotnie ekstrahowano chlorkiem metylenu w rozdzielaczu, następnie usuwano z niego wodę, dodając bezwodny siarczan magnezu. Część rozpuszczalnika odparowywano w wyparce rotacyjnej z regulowanym ciśnieniem firmy Buchi (ciśnienie 540–560 hPa, temperatura 30°C). Przy sporządzaniu wyciągu wodnego z rozmarynu, susz handlowy umieszczano w lnianym woreczku, który następnie przenoszono do naczynia zawierającego zimną wodę. Całość doprowadzano do wrzenia. Po 24 h przechowywania w temperaturze 2°C usuwano woreczek z przyprawami, a otrzymany wyciąg zagęszczano 3-krotnie w wyparce laboratoryjnej firmy Buchi (temperatura 30°C, ciśnienie 50 hPa) (6). Aby sporządzić zawiesinę handlowego preparatu rozmarynu, 1 g preparatu przenoszono do kolbki stożkowej o pojemności 50 ml i zalewano 20 ml 40% alkoholu etylowego. Tak przygotowany olejek eteryczny, wyciąg wodny oraz zawiesinę przechowywano w temperaturze 4°C w szczelnie zamkniętych butelkach z ciemnego szkła.

Do oznaczania właściwości przeciwbakteryjnych rozmarynu wykorzystano następujące gatunki bakterii, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności: *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis* (BI), *Tetracoccus* sp., *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Proteus vulgaris* (458), *Proteus mirabilis* (180), *Escherichia coli* (ATCC 25922) oraz *Klebsiella pneumoniae* (196).

Wrażliwość bakterii na działanie olejku eterycznego, wyciągu wodnego oraz preparatu handlowego z rozmarynu lekarskiego określano metodą stosowaną do oznaczania przeciwdrobnoustrojowej aktywności antybiotyków, którą dostosowano do potrzeb przeprowadzanego eksperymentu w trzydziestu powtórzeniach dla każdego szczepu bakterii (7). Do badań wykorzystywano 24-godzinne hodowle bakterii w płynnym bulionie wzbogaconym, termostatowane w temperaturze 37°C. Po inkubacji dokonywano pomiaru gęstości optycznej zawiesiny drobnoustrojów za pomocą spektrofotometru Spectronic®20 GENESYS przy długości fali 550 nm, bądź (w przypadku patogenów) używając densimatu firmy BioMerieux. Następnie jałowe płytki Petriego szczepiono wgłębnie 0,1 ml zawiesiny bakterii, po czym zalewano ok. 20 ml upłynnionego bulionu z agarem. Płytki Petriego pozostawiano na 30 minut w temperaturze pokojowej w celu zestalenia pożywki, po czym podsuszano je przez 30 minut pod lampą POLON z nawiewem.

Na powierzchni tak przygotowanego podłoża, ustawiano trzy cylinderki ze stali nierdzewnej o średnicy zewnętrznej 8 mm i wewnętrznej 7 mm. Do dwóch cylinderków ustawionych na płycie wprowadzano 0,1 ml badanego olejku eterycznego, wyciągu wodnego lub preparatu handlowego, natomiast trzeci cylinderek napełniano taką samą ilością rozpuszczalnika, użytego dla danego wyciągu z rozmarynu lekarskiego. Płytki pozostawiano na 1 h w temperaturze pokojowej w celu wystąpienia dyfuzji wyciągu do podłoża, a następnie termostatowano w temperaturze 37°C przez 24 h.

Po tym czasie sprawdzano obecność lub brak stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów wokół cylinderków i dokonywano pomiaru średnicy uzyskanych stref zahamowania wzrostu (łącznie ze średnicą cylinderka). Wartość średnicy strefy inhibicji podawano po odjęciu średnicy wewnętrznej cylinderka.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując program statystyczny STATGRAPHICS Plus.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wielkość stref zahamowania wzrostu bakterii G (+) i G (-) wynikającą z działania olejku eterycznego, wyciągu wodnego oraz preparatu handlowego zestawiono w tabelach I i II.

Wzrost zarówno bakterii *Micrococcus sp.*, jak i *Bacillus subtilis* został zahamowany przez działanie olejku eterycznego, wodnego wyciągu oraz preparatu handlowego z rozmarynu (tab. I). Największe strefy zahamowania wzrostu obu szczepów bakterii istotnie statystycznie ($\alpha=0,05$) odnotowano przy zastosowaniu handlowego preparatu rozmarynu, natomiast najmniejsze dla olejku eterycznego. W przypadku wyciągu z rozmarynu suszonego, strefy zahamowania wzrostu bakterii były istotnie mniejsze niż dla handlowego preparatu rozmarynu, ale również świadczyły o silnym działaniu bakteriostatycznym w stosunku do *Micrococcus sp.* i *Bacillus subtilis*.

Tabela I. Wpływ działania olejku, wyciągu i preparatu z rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*) na wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych bakterii G (+) (wartość średnia i odchylenie standardowe) (mm)

Table I. Effect of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil, water extract and commercial preparation on the size of inhibition zones of selected gram-positive bacteria (mean value and standard deviation) (mm)

Rodzaj wyciągu	Wielkość stref zahamowania wzrostu dla wybranych szczepów bakterii (mm)			
	<i>Micrococcus sp.</i> (n=30)	<i>Bacillus subtilis</i> (n=30)	<i>Tetracoccus sp.</i> (n=30)	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=30)
Olejek eteryczny ze świeżego rozmarynu (n=3)	2,2 ^a ±0,4	2,1 ^a ±0,3	0 ^a	0
Wyciąg wodny z suszonego rozmarynu (n=3)	9,9 ^b ±0,4	3,8 ^b ±0,4	10,7 ^c ±0,6	0
Preparat handlowy rozmarynu (n=3)	10,8 ^c ±0,4	5,2 ^c ±0,4	9,8 ^b ±0,4	0

a, b, c – różnice istotne statystycznie przy $\alpha=0,05$

a, b, c – statistically significant difference at $\alpha=0,05$

Przedmiotem badań *Mangeny* i *Muyimy* (8) był olejek eteryczny uzyskany na drodze destylacji z parą wodną ze świeżych liści *Rosmarinus officinalis*. Posługując się metodą krążkową, autorzy określili hamujący wpływ olejku na wzrost *Micrococcus luteus* i *Bacillus subtilis*. Największe strefy zahamowania wzrostu bakterii *Micrococcus luteus* (16,0 mm) oraz *Bacillus subtilis* (14,0 mm) zaobserwowano w przypadku olejku nierozcieńczonego. Autorzy ci (8) ustalili, że za przeciwdrob-

noustrojowe właściwości badanego olejku z *Rosmarinus officinalis* odpowiedzialny był związek fenolowy o nazwie 1,8-cineol, stanowiący główny jego składnik.

W przypadku bakterii *Tetracoccus sp.* (tab. I) stwierdzono występowanie istotnych statystycznie ($\alpha=0,05$) stref zahamowania wzrostu bakterii wokół cylinderków wypełnionych wyciągiem wodnym z suszonego rozmarynu oraz handlowym preparatem rozmarynu. Omawiany szczep okazał się niewrażliwy na działanie olejku eterycznego ze świeżego rozmarynu. W związku z tym można sądzić, iż działanie bakteriostatyczne wyciągów z rozmarynu w stosunku do bakterii *Tetracoccus sp.* wynika z obecności w składzie wyciągu wodnego oraz preparatu handlowego nietlotnych składników roślinnych, których olejek uzyskany ze świeżych liści rozmarynu był pozbawiony.

Żaden z badanych wyciągów z rozmarynu nie działał bakteriostatycznie wobec *Staphylococcus aureus* – nie zaobserwowano obecności stref zahamowania wzrostu bakterii wokół cylinderków wypełnionych omawianymi wyciągami (tab. I). Badania wykonane przez *Seydima i Sarikusa* (9) wskazują na oporność komórek *Staphylococcus aureus* w stosunku do lotnych komponentów rozmarynu lekarskiego. Przedmiotem badań były powłoki jadalne sporządzone na bazie białek serwatki oraz olejku z rozmarynu, który dodawano w czterech różnych stężeniach: 1, 2, 3 oraz 4%. Z zestalonych powłok wycinano krążki o określonej średnicy, które umieszczano na płytkach z wysianym szczepem *Staphylococcus aureus*. W żadnym z przypadków nie stwierdzono obecności stref zahamowania wzrostu bakterii.

Tab e l a II. Wpływ działania olejku, wyciągu i preparatu z rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*) na wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych bakterii G (-) (wartość średnia i odchylenie standardowe) (mm)

Tab l e II. Effect of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil, water extract and commercial preparation on the size of inhibition zones of selected gram-negative bacteria (mean value and standard deviation) (mm)

Rodzaj wyciągu	Wielkość stref zahamowania wzrostu dla wybranych szczepów bakterii (mm)			
	<i>Proteus vulgaris</i> (n=30)	<i>Proteus mirabilis</i> (n=30)	<i>Escherichia coli</i> (n=30)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=30)
Olejek eteryczny ze świeżego rozmarynu (n=3)	1,0 ^b ±0,0	1,0 ^b ±0,3	1,0 ^b ±0,4	0
Wyciąg wodny z suszonego rozmarynu (n=3)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0
Preparat handlowy rozmarynu (n=3)	5,2 ^c ±0,4	0 ^a	0 ^a	0

a, b, c – różnice istotne statystycznie przy $\alpha=0,05$

a, b, c – statistically significant difference at $\alpha=0,05$

Największą aktywnością w stosunku do większości bakterii G (-) cechował się olejek eteryczny uzyskany z liści świeżego rozmarynu. Strefy zahamowania wzrostu bakterii na płytkach wokół cylinderków wypełnionych olejkiem zaobserwowano w przypadku bakterii *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* oraz *Escherichia coli* (tab. II). Dane literaturowe (10) podają, iż bakterie G (-) charakteryzują się wyższą opornością w porównaniu z bakteriami G (+) na działanie wyciągów z rozmarynu,

choć istnieją wśród nich wyjątki. *Proteus vulgaris*, podobnie jak *Vibrio vulnificus* oraz *Aeromonas hydrophila*, wykazuje znacznie większą wrażliwość na wyciągi z przypraw niż wiele bakterii G (+). Natomiast *Listeria monocytogenes* swą opornością dorównuje *Pseudomonas aeruginosa* (11, 12).

Największe zahamowanie wzrostu bakterii *Proteus vulgaris* (tab. II) odnotowano w przypadku handlowego preparatu rozmarynu. Mniejszą wrażliwość badany szczep wykazał wobec działania olejku eterycznego ze świeżego rozmarynu, natomiast wokół cylinderków wypełnionych wyciągiem wodnym z suszonego rozmarynu nie odnotowano występowania stref zahamowania wzrostu bakterii *Proteus vulgaris*.

Zastosowana metoda cylinderkowa oznaczania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykazała wrażliwość bakterii *Proteus mirabilis* oraz *Escherichia coli* wyłącznie na olejek eteryczny uzyskany z liści świeżego rozmarynu (tab. II). Można zatem przypuszczać, iż odpowiedzialność za bakteriostatyczne właściwości rozmarynu w stosunku do powyższych szczepów bakterii ponoszą lotne składniki roślinne, które zawiera olejek oddestylowany ze świeżych liści rozmarynu.

Suche przyprawy ze względu na uboższy skład w porównaniu z przyprawami naturalnymi, charakteryzują się niewielkim wpływem na hamowanie wzrostu drobnoustrojów w żywności. Efekt konserwujący potęgowany jest poprzez kondensację zawartości związków biologicznie czynnych obecnych w przyprawach. Najlepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe posiadają olejki eteryczne, następnie ekstrakty lipidowe oraz wyciągi etanolowe przypraw. Zestawienie zamykają susze roślinne i ich wodne wyciągi (12, 13).

Hammer i współpr. (14), w ramach oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej olejku eterycznego z rozmarynu ustalili, że *Klebsiella pneumoniae* była niszczona mniej skutecznie niż *Escherichia coli* czy *Staphylococcus aureus*. W powyższych badaniach nie stwierdzono hamującego wpływu olejku eterycznego, wyciągu wodnego czy też preparatu handlowego z rozmarynu na wzrost bakterii *Klebsiella pneumoniae*.

WNIOSKI

1. Badany olejek eteryczny, wyciąg wodny oraz preparat handlowy z rozmarynu wykazywały aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do większości badanych szczepów. Świadczy to o tym, iż omawiane wyciągi są źródłem substancji hamujących wzrost drobnoustrojów.

2. W przypadku większości szczepów wrażliwych na działanie wyciągów z przypraw, najszersze spektrum działania wykazywał wyciąg ze świeżego rozmarynu, natomiast największą skuteczność hamowania wzrostu drobnoustrojów posiadał handlowy preparat rozmarynu.

3. Bakterie G (+) charakteryzowały się wyższą wrażliwością na składniki wyciągów z rozmarynu niż bakterie G (-).

4. Badane wyciągi z rozmarynu nie hamowały wzrostu patogennych szczepów *Staphylococcus aureus* i *Klebsiella pneumoniae*, co może świadczyć o oporności tych bakterii na działanie składników roślinnych zawartych w rozmarynie lekarskim.

E. Hać-Szymańczuk, J. Roman, K. Bednarczyk

ESTIMATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ROSEMARY (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) ESSENTIAL OIL, WATER EXTRACT AND COMMERCIAL PREPARATION

Summary

The aim of work was to test the antibacterial activity of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil, water extract and commercial preparation. In the present study, rosemary extracts were investigated for activity against *Bacillus subtilis*, *Micrococcus sp.*, *Tetracoccus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella pneumoniae*. The antibacterial activities of rosemary extracts were tested by the cylinder diffusion method. The efficiency of the extracts was linked to the type and depended on the test bacteria strain too. Among all the bacteria tested, gram-positive were more sensitive to the activity of rosemary extracts than gram-negative.

PIŚMIENNICTWO

1. Kostrzewa E.: Przyprawy ziołowe stosowane w przemyśle spożywczym. Przem. Spoż., 1999; 53 (3): 14-16. – 2. Hlava B., Lanska D.: Rośliny przyprawowe. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1983; 53-94. – 3. Djeddi S., Bouchenah N., Settar I., Skaltsa H. D.: Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Algeria. Chem. of Natural Comp., 2007; 43 (4): 487-490. – 4. Schweiggert U., Carle R., Schieber A.: Conventional and alternative processes for spice production – a review. Trends in Food Sci. and Technol., 2007; 18 (5): 260-268. – 5. Bialecka-Florjańczyk E., Włostowska J.: Ćwiczenia laboratoryjne z chemii organicznej. Wydawnictwo SGGW Warszawa, 2007; 34-36. – 6. Jankiewicz L., Słowiński M.: Technologia produkcji wędlin, część 2: Wędzonki parzone. Polskie Wyd. Fachowe, Warszawa, 1999; 69-70. – 7. Praca zbiorowa: Farmakopea Polska IV. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1970; II, 54-58. – 8. Mangena T., Muyima N. Y. O.: Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeasts strains. Letters in Applied Microb., 1999; 28 (4): 291-296. – 9. Seydim A. C., Sarikus G.: Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Research Int., 2006; 39: 639-644. – 10. Kalemba D.: Przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe właściwości olejków eterycznych. Postępy Mikrob., 1998; 38 (2): 185-203.
11. Kostrzewa E.: Właściwości funkcjonalne przypraw ziołowych stosowanych w przemyśle spożywczym, Przem. Ferment. i Owocowo-Warzywny, 1996; 40 (10): 27-29. – 12. Burt S.: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Int. J. Food Microb., 2004; 94 (3): 223-253. – 13. Preuss H. G., Eschard B., Enig M., Brook I., Elliott T.B.: Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for grampositive and gramnegative bacteria. Molecular and Cellular Biochem., 2005; 272 (2): 29-34. – 14. Hammer K. A., Carson C. F., Riley T.V.: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. of Applied Microb., 1999; 86 (2): 985-990.

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