

Elżbieta Hać-Szymańczuk, Edyta Lipińska, Stanisław Błażej, Katarzyna Bieniak

OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ SZAŁWII LEKARSKIEJ (*SALVIA OFFICINALIS* L.)*

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Kierownik Zakładu: dr hab. S. Błażej, prof. nadzw.

*Tematem niniejszej pracy było zbadanie aktywności przeciwbakteryjnej olejku eterycznego wyekstrahowanego z liści oraz olejku handlowego i wyciągu wodnego z suszonej szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.) w stosunku do wybranych szczepów bakterii. Aktywność przeciwbakteryjną olejków oraz ekstraktu określano za pomocą dyfuzyjnej metody cylinderkowej. Efektywność działania była związana z formą użytej szalwii oraz zależała od badanego szczepu bakterii. Najszerszym spektrum oraz największą skutecznością przeciwdrobnoustrojowego działania charakteryzował się olejek handlowy z szalwii.*

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

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

Szałwia jest rośliną należącą do rodziny *Lamiaceae* i pochodzi z regionu basenu Morza Śródziemnego. Uprawiana jest także w wielu krajach Europy Środkowej (również Polsce) oraz w Ameryce Północnej (1). Znana jest głównie z właściwości leczniczych ale jest również cenioną rośliną przyprawową.

Szałwia wykazuje działanie przeciwbakteryjne, fungi- i wirusostatyczne. Dowiedziono (2, 3), że jest aktywna wobec bakterii gramododatnich (*Staphylococcus epidermidis*), natomiast bakterie gramujemne (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) oraz patogenne szczepy grzybów (*Candida albicans*) nie są wrażliwe na jej działanie. Shirazini i współpr. (4) przeprowadzili badania, w których wykazali działanie przeciwbakteryjne szalwii wobec bakterii *Proteus vulgaris*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* oraz *Salmonella* Typhi. Siła jej działania przeciwbakteryjnego jest porównywalna z działaniem niektórych antybiotyków. Stosowanie wyciągów oraz olejków eterycznych z szalwii lekarskiej staje się obecnie alternatywą w stosunku do chemicznych środków konserwujących stosowanych w przemyśle spożywczym.

* Badanie wykonane w ramach projektu badawczego własnego nr N N312 257040.

Celem pracy było określenie aktywności przeciwbakteryjnej olejków eterycznych (handlowego oraz wyekstrahowanego ze świeżych liści) oraz wyciągu wodnego z suszonej szalwii w stosunku do wybranych szczepów bakterii, które mogą występować w żywności pochodzenia zwierzęcego.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań był handlowy olejek eteryczny (n=3), olejek eteryczny wyekstrahowany ze świeżych liści szalwii (n=3) oraz wyciąg wodny z suszonej szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*).

W celu ekstrakcji olejku eterycznego, świeże liście szalwii rozdrabniano, zalewano wodą i poddawano destylacji w aparacie do otrzymywania olejków eterycznych według Derynga firmy Simax (5). Ochłodzony destylat czterokrotnie ekstrahowano chlorkiem metylenu w rozdzielaczu, a następnie usuwano wodę, dodając bezwodny siarczan magnezu. Część rozpuszczalnika odparowywano w wyparce laboratoryjnej z regulowanym ciśnieniem firmy Büchi (ciśnienie 540-560 hPa, temperatura 30°C). Przy sporządzaniu wyciągu wodnego z szalwii, susz handlowy umieszczano w lnianym woreczku, który przenoszono do naczynia zawierającego zimną wodę. Całość doprowadzano do wrzenia. Po 24 h przechowywania wyciągu w temperaturze 4°C usuwano woreczek z suszem. Otrzymany wyciąg zagęszczano do masy użytego surowca w wyparce firmy Büchi (ciśnienie 50 hPa, temperatura 30°C) (6). W celu przygotowania do oznaczeń olejku handlowego (Dr Beta, Pollena Aroma), rozcieńczano go w stosunku 1:1 z heksanem.

Do oznaczenia właściwości przeciwbakteryjnych szalwii wykorzystano szczepy bakterii, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności: *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Tetracoccus* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* 458, *Proteus mirabilis* 180, *Escherichia coli* ATCC 25922 oraz *Klebsiella pneumoniae* 196.

Wrażliwość bakterii na działanie olejków eterycznych oraz wyciągu wodnego z szalwii lekarskiej określano metodą stosowaną do oznaczania przeciwdrobnoustrojowej aktywności antybiotyków, którą dostosowano do potrzeb eksperymentu przeprowadzanego w trzydziestu powtórzeniach dla każdego szczepu bakterii (7). Do badań wykorzystywano 24-godzinne hodowle bakterii w płynnym bulionie wzbogaconym (temperatura 37°C). Po inkubacji dokonywano pomiaru gęstości optycznej zawiesiny drobnoustrojów przy użyciu spektrofotometru Spectronic®20 GENESYS przy długości fali 550 nm lub w przypadku szczepów patogennych 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 pozostawiano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w celu zestalenia pożywki, po czym podsuszano je pod lampą POLON z nawiewem przez 30 minut. Na powierzchni podłoża, ustawiano

trzy jałowe cylinderki ze stali nierdzewnej o średnicy zewnętrznej 8 mm i wewnętrznej 7 mm. Do dwóch cylinderków wprowadzano 0,1 ml badanego olejku lub wyciągu, natomiast trzeci napełniano taką samą objętością rozpuszczalnika, użytego dla danego olejku (chlorek metylenu lub heksan) lub wyciągu (woda). Przygotowane w ten sposób płytki termostatowano przez 24 h w temperaturze 37°C. Następnie sprawdzano obecność lub brak stref zahamowania wzrostu wokół cylinderków. Pomiaru średnicy uzyskanych stref zahamowania wzrostu dokonywano łącznie ze średnicą cylinderka. Wyniki uzyskane podczas pomiaru strefy inhibicji podawano po odjęciu średnicy wewnętrznej cylinderka. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu STATGRAPHICS Plus, stosując jednoczynnikową analizę wariancji oraz test *Tukey'a* HSD.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych szczepów bakterii gramdodatnich i gramujemnych, wynikającą z wynikiem działania olejków eterycznych oraz wyciągu wodnego z szałwii lekarskiej zestawiono w tab. I oraz II.

Aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec szczepu bakterii *Bacillus subtilis* charakteryzowały się zarówno olejki, jak i ekstrakt wodny. Istotnie największe ($\alpha=0,05$) zahamowanie wzrostu szczepu *Bacillus subtilis* odnotowano w przypadku zastosowania olejku handlowego (tab. I), natomiast najmniejsze – stosując olejek wyekstrahowany z liści świeżej szałwii. Różnice w wielkości stref zahamowania wzrostu tych bakterii mogły być spowodowane składem chemicznym badanych ekstraktów. *Sivropouolu* i współpr. (8) podają, że najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe spośród związków zawartych w szałwii lekarskiej wobec bakterii *Bacillus subtilis* wykazuje α -tujon oraz 1,8-cyneol. *Longaray Delamare* i współpr. (9) do tych związków dodają jeszcze kamforę, borneol i β -pinen.

Szczepy bakterii *Staphylococcus aureus* i *Tetracoccus* sp. były wrażliwe jedynie na działanie olejku handlowego, natomiast *Micrococcus* sp. - również olejku ze świeżej szałwii, przy czym strefy zahamowania wzrostu były w tym przypadku istotnie ($\alpha=0,05$) mniejsze w porównaniu z uzyskanymi dla olejku handlowego (tab. I). *Wolski* i współpr. (10) porównując aktywność olejków eterycznych oraz preparatów galenowych uzyskanych z liści szałwii lekarskiej, stwierdzili że wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* był skutecznie hamowany przez działanie olejku eterycznego, a jego minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) wynosiło 2,5 mg/ml. Z kolei *Marino* i współpr. (11) wykazali, że szałwia jest szczególnie aktywna wobec bakterii gramdodatnich i olejek w stężeniu 800 mg/kg skutecznie hamował wzrost *Micrococcus* sp. Wydaje się, że bakterie *Tetracoccus* sp. są wrażliwe jedynie na działanie lotnych składników szałwii w dużym stężeniu (olejek handlowy).

Tabela I. Wpływ działania olejków oraz wyciągu z szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*) na wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych bakterii gramododatnich (wartość średnia i odchylenie standardowe) [mm]

Table I. Effect of the sage (*Salvia officinalis*) essential oils and water extract 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>Bacillus subtilis</i> (n=30)	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=30)	<i>Micrococcus sp.</i> (n=30)	<i>Tetracoccus sp.</i> (n=30)
Olejek eteryczny z liści świeżej szalwii (n=3)	1,2 ^a ± 0,6	0 ^a	3,5 ^b ± 1,2	0 ^a
Wyciąg wodny z suszonej szalwii (n=3)	4,3 ^b ± 1,4	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Olejek handlowy dr Beta (n=3)	5,2 ^b ± 3,2	4,0 ^b ± 2,4	5,2 ^c ± 2,0	3,8 ^b ± 2,4

a, b, c - różne indeksy przy wartościach w tej samej kolumnie oznaczają statystycznie istotne różnice między tymi wartościami dla $\alpha=0,05$.

a, b, c – value from the same column, with different superscripts, are significantly different at $\alpha=0.05$.

Tabela II. Wpływ działania olejków oraz wyciągu z szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*) na wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych bakterii gramujemnych (wartość średnia i odchylenie standardowe) [mm]

Table II. Effect of the sage (*Salvia officinalis*) essential oils and water extract 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>Escherichia coli</i> (n=30)	<i>Proteus vulgaris</i> (n=30)	<i>Proteus mirabilis</i> (n=30)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=30)
Olejek eteryczny z liści świeżej szalwii (n=3)	0 ^a	2,3 ^a ± 0,7	3,5 ^b ± 1,5	0 ^a
Wyciąg wodny z suszonej szalwii (n=3)	2,7 ^b ± 0,6	2,8 ^b ± 0,9	0 ^a	0 ^a
Olejek handlowy dr Beta (n=3)	3,8 ^c ± 1,4	4,2 ^c ± 1,8	3,4 ^b ± 1,5	0 ^a

a, b, c - różne indeksy przy wartościach w tej samej kolumnie oznaczają statystycznie istotne różnice między tymi wartościami dla $\alpha=0,05$.

a, b, c – value from the same column, with different superscripts, are significantly different at $\alpha=0.05$.

Olejki wyekstrahowane ze świeżej szalwii okazały się nieaktywne wobec bakterii *Escherichia coli*, natomiast działanie wyciągu wodnego oraz olejku handlowego z szalwii wywołało istotne ($\alpha=0,05$) zahamowanie wzrostu tego gatunku (tab. II). Hać-Szymańczuk i współpr. (12) w badaniach dotyczących wpływu rozmarynu na *E. coli* oznaczyli jego aktywne działanie jedynie w przypadku olejku ze świeżych liści. Natomiast w literaturze znajduje się wiele doniesień dotyczących oporności bakterii *E. coli* wobec różnych odmian szalwii. Kelen i Tepe (13) podają, że *Salvia aucheri var aucheri*, *Salvia aramiensis* oraz *Salvia pilifera* nie zawierają związków czynnych, które hamowałyby wzrost tych bakterii.

Właściwości bakteriostatyczne wobec bakterii *Proteus vulgaris* (tab. II) stwierdzono w przypadku wszystkich stosowanych w pracy ekstraktów szałwii, przy czym największe strefy zahamowania zanotowano w przypadku olejku handlowego. Podobne wyniki uzyskali *Buchwald* i współpr. (14), badając właściwości przeciwdrobnoustrojowe wyciągu etanolowego z korzeni szałwii, który skutecznie hamował wzrost bakterii *Proteus vulgaris*. Autorzy ci (14) uzasadniają te właściwości obecnością w wyciągu diterpenów oraz kwasów fenolowych.

Bakterie *Proteus mirabilis* okazały się niewrażliwe jedynie na działanie wyciągu wodnego z szałwii, natomiast *Klebsiella pneumoniae* na działanie wszystkich ekstraktów szałwii (tab. II). Wydaje się, że cechy gatunkowe szałwii używanej w badaniach mogły mieć wpływ na wynik oznaczenia, ponieważ *Kivrak* i współpr. (15) podają, że olejki uzyskane z *Salvia potentillifolia* hamowały wzrost bakterii *Klebsiella pneumoniae* już przy niskim stężeniu (25 µg/ml), czego nie zaobserwowano w niniejszym doświadczeniu.

WNIOSKI

1. Olejki wyekstrahowane z liści świeżej szałwii, olejek handlowy oraz wyciąg wodny z suszu szałwii wykazały się aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec większości badanych szczepów. Świadczy to, że badane wyciągi były źródłem substancji hamujących wzrost drobnoustrojów.

2. W przypadku większości szczepów wrażliwych na działanie wyciągów z szałwii, najszersze spektrum działania oraz największą skuteczność posiadał olejek handlowy.

3. Wrażliwość bakterii gramdodatnich na działanie szałwii była porównywalna z wrażliwością bakterii gramujemnych.

4. Badane wyciągi z szałwii nie hamowały wzrostu patogennego szczepu *Klebsiella pneumoniae*, co mogło świadczyć o jego oporności na działanie składników roślinnych zawartych w badanej odmianie szałwii (*Salvia officinalis*).

E. Hać-Szymańczuk, E. Lipińska, St. Błazejak, K. Bieniak

ESTIMATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE SAGE (*SALVIA OFFICINALIS*)

Summary

The aim of the work was to test antibacterial activity of sage (*Salvia officinalis*) essential oils and water extract. In the present study, sage was investigated for activity against *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Tetracoccus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The antibacterial activities of the sage were tested by the cylinder diffusion method. The efficiency of the sage was linked to the type and depended on the bacteria strain too. The commercial oil was characterized by broad spectrum and the most antibacterial efficiency.

PIŚMIENNICTWO

1. *Raghavan S. Uhl.*: Handbook of spices, seasoning and flavourings. CRC Press, Boca Raton, 2006; 96-150.- 2. *Kuźma L., Różalski M., Walencka E., Różalska B., Wysokińska H.*: Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salviposone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomed.*, 2005; 14 (1): 31-35.- 3. *Farcasanu I.O., Opera E.*: Ethanol extracts of *Salvia officinalis* exhibit antifungal properties against *Saccharomyces cerevisiae* cells. *An. Univ. Bucuresti Chim.*, 2006; 15 (1); 51-55.- 4. *Shirazini M.H., Ranjabar R., Eshraghi S., Amin G., Seyed Nouri M., Bazzaz N.*: Inhibitory effects of sage extract on the growth of enteric bacteria. *Pakistan. J. Biol. Sci.*, 2008; 11 (3), 487-489.- 5. *Bialecka-Florjańczyk W., Włostowska J.*: Ćwiczenia laboratoryjne z chemii organicznej. Wyd. 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. Wyd. PZWL, Warszawa, 1970; II: 54-58.- 8. *Sivropoulou A., Nikolaou C., Papanikolaou E., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M.*: Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. Agric. Food Chem.*, 1997; 45 (8); 3197-3201.- 9. *Longaray Delamare A.P., Moschen-Pistorello I.T., Artico L., Atti Serafini L., Echeverrigaray S.*: Antibacterial activity of the essentials oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.*, 2007; 100; 603-608.- 10. *Wolski T., Holderna-Kędzia E., Ludwiczak A.*: Ocena składu chemicznego oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejków eterycznych i preparatów galenowych otrzymywanych z liści rozmarynu i szałwii lekarskiej. *Postępy Fitoter.*, 2001; (4); 6-11.
11. *Marino M., Bersani C., Comi G.*: Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essentials oil from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int. J. Food Mikrob.*, 2001; 67 (4); 187-195.- 12. *Hać-Szymańczuk E., Roman J., Bednarczyk K.*: Ocena aktywności przeciwbakteryjnej olejku eterycznego, wyciągu wodnego oraz preparatu handlowego z rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009; 42 (3): 979-984.- 13. *Kelen M., Tepe B.*: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essentials oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technol.*, 2008; 99 (10); 4096-4100.- 14. *Buchwald W., Holderna-Kędzia E., Mścisz A.*: Aktywność mikrobiologiczna wyciągu etanolowego z korzeni szałwii czerwonokorzeniowej (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) uprawianej w Polsce. *Postępy Fitoter.*, 2007; 3: 133-135.- 15. *Kivrak I., Duru M.E., Ozturk M., Mercan N., Harmandar M., Topcu G.*: Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chem.*, 2009; 116; 470-479.

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