

Elżbieta Hać-Szymańczuk, Edyta Lipińska, Olga Grzegorzółka

## OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ OREGANO (*Origanum vulgare* L.)\*

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

*Tematem niniejszej pracy była ocena aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów (wodnego i alkoholowego) z suszonego oregano (*Origanum vulgare* L.) oraz olejku eterycznego wyekstrahowanego ze świeżych liści w stosunku do wybranych szczepów bakterii. Aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów oraz olejku określano za pomocą dyfuzyjnej metody krążkowej. Efektywność działania była związana z formą użytego oregano oraz zależała od badanego szczepu bakterii. Najszersze spektrum oraz największą skuteczność przeciwdrobnoustrojową wykazał ekstrakt wodny z oregano.*

Hasła kluczowe: aktywność przeciwbakteryjna, *Origanum vulgare* L., zahamowanie wzrostu

Key words: antibacterial activity, *Origanum vulgare* L., inhibitory effect

Oregano należy do rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*). Występuje w Europie, Azji Środkowej oraz w Ameryce Północnej. Jest rośliną trwałą, intensywnie pachnącą i miododajną. W Polsce występuje lebiodka pospolita (*Origanum vulgare* L.), która rośnie w zaroślach, na skrajach lasów i suchych, słonecznych pagórkach. Znana jest zarówno jako przyprawa oraz ceniona roślina lecznicza (1).

Olejki eteryczne oraz ekstrakty (wodne lub alkoholowe), uzyskane z oregano wykazują wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową. Nedorostova i współpr. (2) przebadali 27 różnych olejków eterycznych i stwierdzili, że olejek z *Origanum vulgare* L. można zaliczyć, zaraz po olejku z *Armoracia rusticana* (chrzan pospolity) i *Allium sativum* (czosnek pospolity), do grupy najbardziej aktywnych w stosunku do drobnoustrojów. Oregano działa na szerokie spektrum bakterii oraz pleśni, między innymi na *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* i *Penicillium* (3). Zasadne wydaje się być stosowanie oregano jako naturalnego środka konserwującego żywność, ograniczającego wzrost drobnoustrojów powodujących zatrucia pokarmowe i psucie się żywności.

Celem pracy była ocena aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów (wodnego i alkoholowego) z suszonego oregano oraz olejku eterycznego wyekstrahowanego ze świeżych liści oregano w stosunku do wybranych szczepów bakterii, które mogą występować w żywności pochodzenia zwierzęcego.

## MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań był ekstrakt wodny (n=3) i alkoholowy z suszonego oregano (n=3) oraz olejek eteryczny wyekstrahowany ze świeżych liści oregano (n=3).

Ekstrakt wodny i alkoholowy z suszu oregano otrzymano metodą ekstrakcji ciągłej z użyciem uniwersalnego systemu ekstrakcyjnego B-811 (Universal Extraction System B-811) w automatycznym aparacie Soxhleta (Büchi). Do przygotowania każdego wyciągu używano po 40 g suszu oregano rozłożonego do 8 gilz ekstrakcyjnych (po 5 g w każdej gilzie). Jako rozpuszczalnika używano odpowiednio wody destylowanej lub 70% alkoholu etylowego. Surowiec w pojedynczej gilzie ekstrahowano 150 cm<sup>3</sup> odpowiedniego rozpuszczalnika przez 15 cykli, utrzymując temperaturę wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskane porcje połączono, otrzymując po ok. 550 cm<sup>3</sup> ekstraktów surowych, które przesączono przez filtr bibułowy. Następnie zagęszczono je w rotacyjnej wyparce Rotovaporator R-205 (Büchi) do masy suszu (40 g). W celu ekstrakcji olejku eterycznego świeże liście oregano rozdrabniano, zalewano wodą i poddawano destylacji w aparacie do otrzymywania olejków eterycznych według Derynga firmy Simax (4). 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).

Do oznaczenia właściwości przeciwbakteryjnych oregano wykorzystano szczepy bakterii, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności: *Micrococcus sp.*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Tetracoccus sp.*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* 458, *Proteus mirabilis* 180, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 oraz *Klebsiella pneumoniae* 196.

Wrażliwość bakterii na działanie ekstraktów oraz olejku eterycznego z oregano określano metodą stosowaną do oznaczania przeciwdrobnoustrojowej aktywności antybiotyków, którą dostosowano do potrzeb eksperymentu przeprowadzonego w trzydziestu powtórzeniach dla każdego szczepu bakterii (5). Do badań wykorzystywano 24-godzinne hodowle bakterii w płynnym bulionie (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 za pomocą jałowej wymazówki posiewano powierzchniowo inokulum bakteryjne (10<sup>7</sup> jtk/cm<sup>3</sup>) na płytę Petriego z podłożem Mueller-Hinton. Na powierzchnię podłoża наносono 4 jałowe krążki bibułowe o średnicy 6 mm i na trzy krążki aplikowano po 20 µl ekstraktu wodnego, alkoholowego lub olejku eterycznego, natomiast na czwarty наносono odpowiednio (w zależności od rodzaju rozpuszczalnika) 20 µl jałowej wody, 70% etanolu lub DMSO. Przygotowane w ten sposób płytki termostatowano przez 24 h w temperaturze 37°C. Następnie sprawdzano obecność lub brak stref zahamowania wzrostu wokół krążków. Pomiaru średnicy uzyskanych stref zahamowania wzrostu dokonywano łącznie ze średnicą krążka, a wyniki podawano po odjęciu średnicy krążka. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem

programu STATGRAPHICS Plus, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (One Way ANOVA) oraz test *Tukey'a* HSD.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, będącą wynikiem działania ekstraktów oraz olejku eterycznego z oregano zestawiono w tab. I i II.

Tab. I. Wpływ działania wodnego i alkoholowego ekstraktu oraz olejku z oregano (*Origanum vulgare* L.) na wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych bakterii Gram-dodatnich (wartość średnia i odchylenie standardowe) [mm]

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

Tab. I. Effect of the origanum (*Origanum vulgare* L.) water and alcohol extracts and essential oil on the size of inhibition zones of selected Gram-positive bacteria (mean value and standard deviation) [mm]

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

Rodzaj ekstraktu	Wielkość stref zahamowania wzrostu dla wybranych szczepów bakterii [mm] $\pm$ SD				
	<i>Bacillus subtilis</i> (n=30)	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=30)	<i>Micrococcus sp.</i> (n=30)	<i>Tetracoccus sp.</i> (n=30)	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=30)
Ekstrakt wodny z suszonego oregano (n=3)	2,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,65	3,1 <sup>b</sup> $\pm$ 1,22	8,1 <sup>c</sup> $\pm$ 3,58	3,2 <sup>b</sup> $\pm$ 1,05	3,6 <sup>c</sup> $\pm$ 0,49
Ekstrakt alkoholowy z suszonego oregano (n=3)	3,9 <sup>c</sup> $\pm$ 1,89	0,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19	3,9 <sup>b</sup> $\pm$ 1,62	2,9 <sup>c</sup> $\pm$ 3,37	1,3 <sup>b</sup> $\pm$ 0,56
Olejek eteryczny z liści świeżego oregano (n=3)	0,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,43	1,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,57	0,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,12	0 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11

Aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec szczepu bakterii *Bacillus subtilis* charakteryzowały się zarówno ekstrakty, jak i olejek eteryczny. Istotnie ( $\alpha=0,05$ ) największe zahamowanie wzrostu szczepu *Bacillus subtilis* zaobserwowano w przypadku zastosowania ekstraktu alkoholowego (tab. I), natomiast najmniejsze – olejku eterycznego ze świeżego oregano. Według *Sabahat i Perween* (6), którzy oceniali działanie naparu, wywaru i olejku eterycznego z oregano na bakterie *Bacillus subtilis*, zdecydowanie najsilniejsze właściwości hamowania wzrostu miał olejek eteryczny, znacznie słabsze napar a wywar z oregano nie posiadał właściwości hamowania wzrostu badanych bakterii.

Tab. II. Wpływ działania wodnego i alkoholowego ekstraktu oraz olejku z oregano (*Origanum vulgare* L.) na wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych bakterii Gram-ujemnych (wartość średnia i odchylenie standardowe) [mm]

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

Tab. II. Effect of the origanum (*Origanum vulgare* L.) water and alcohol extracts and essential oil on the size of inhibition zones of selected Gram-negative bacteria (mean value and standard deviation) [mm]

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

Rodzaj ekstraktu	Wielkość stref zahamowania wzrostu dla wybranych szczepów bakterii [mm] $\pm$ SD				
	<i>Escherichia coli</i> (n=30)	<i>Proteus vulgaris</i> (n=30)	<i>Proteus mirabilis</i> (n=30)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=30)	<i>Salmonella Enteritidis</i> (n=30)
Ekstrakt wodny z suszonego oregano (n=3)	0a	3,3b $\pm$ 0,99	4,1b $\pm$ 1,24	0a	0a
Ekstrakt alkoholowy z suszonego oregano (n=3)	0a	3,2b $\pm$ 1,35	0,6a $\pm$ 0,19	0a	0,5b $\pm$ 0,11
Olejek eteryczny z liści świeżego oregano (n=3)	0,44b $\pm$ 0,12	0,9a $\pm$ 0,28	0,6a $\pm$ 0,31	0,8b $\pm$ 0,15	0,3a,b $\pm$ 0,11

Wszystkie badane wyciągi hamowały wzrost bakterii *Staphylococcus aureus*, przy czym największe zahamowanie uzyskano przy zastosowaniu ekstraktu wodnego i olejku eterycznego (tab. I). Najmniejsze strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków z naniesionym roztworem stwierdzono w przypadku wyciągu alkoholowego. *Busatta* i współpr. (7), badali metodą zbliżoną do stosowanej w niniejszej pracy, właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku eterycznego z oregano wobec bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Wielkość stref zahamowania wzrostu dla tej bakterii oscylowała wokół wartości 26,8 mm, co nie znalazło potwierdzenia w niniejszej pracy.

Największą aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii *Micrococcus sp.* i *Enterococcus faecalis* charakteryzował się ekstrakt wodny, natomiast w przypadku ekstraktu alkoholowego strefy zahamowania były blisko o połowę mniejsze niż dla ekstraktu wodnego (tab. I). Słabsze właściwości hamujące wzrost powyższych bakterii stwierdzono w wyniku działania olejku eterycznego. Przedmiotem badań *Baydar* i współpr. (8) było antybakteryjne działanie i skład chemiczny olejków eterycznych uzyskanych z czterech gatunków roślin należących do rodziny *Lamiaceae*, w tym *Origanum minutiflorum* i *Origanum onites*. Ustalono, że za przeciwdrobnoustrojowe właściwości badanych olejków odpowiedzialne były takie związki jak: karwakrol,  $\gamma$ -terpinen i p-cymen, które występują w oregano w dużej ilości.

Jedynie olejek eteryczny ze świeżego oregano nie wykazał działania hamującego wzrost bakterii *Tetracoccus sp.* (tab. I). *Gniewosz* i współpr. (9) badali właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktu metanolowego z cząbrku lekarskiego (*Satureja montana*) wobec bakterii *Tetracoccus sp.*. Cząbrak górski, podobnie jak oregano, należy do rodziny jasnowatych (*Lamiaceae*) i zawiera w swoim składzie olejek eteryczny (0,5%), garbniki (5%) i flawonoidy. Autorzy (9) wskazali, że prawdopodobnie to flawonoidy (7-glukozyd luteoliny) oraz kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy, kofeinowy, rozmarynowy) były odpowiedzialne za silne przeciwbakteryjne działanie wobec badanych szczepów.

Spośród badanych szczepów bakterii Gram-ujemnych, zarówno *Escherichia coli*, jak i *Klebsiella pneumoniae* były wrażliwe jedynie na działanie olejku eterycznego (tab. II). *Busatta* i współpr. (7) charakteryzowali właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku eterycznego z oregano działającego wobec bakterii *Escherichia coli* ATCC 25922. Wielkość strefy zahamowania wzrostu dla tych bakterii pod wpływem działania olejku z oregano wynosiła 17,3 mm. *Şahin* i współpr. (3) podjęli próbę określenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych oregano w stosunku do szczepu *Klebsiella pneumoniae* A137. Aplikacja na krążki 10  $\mu$ l olejku eterycznego lub 300  $\mu$ g ekstraktu metanolowego z oregano nie zahamowała wzrostu badanego szczepu.

Właściwości bakteriostatyczne wobec bakterii *Proteus vulgaris* i *Proteus mirabilis* stwierdzono w przypadku zastosowania wszystkich ekstraktów z oregano, przy czym istotnie ( $\alpha=0,05$ ) największe strefy zahamowania wzrostu zanotowano w wyniku działania ekstraktu wodnego (tab. II). *Baydar* i współpr. (8) badali działanie olejków eterycznych uzyskanych z dwóch gatunków oregano, rozcieńczonych w proporcjach 1/50, 1/100, 1/200 i 1/300 w absolutnym alkoholu etylowym na wzrost *Proteus vulgaris* FMC 1. *Origanum minutiflorum* i *Origanum onites* działały

hamująco na ten szczep przy stężeniu olejku eterycznego 1/50 i 1/100, a *Origanum onites* dodatkowo w stężeniu 1/200. Marino i współpr. (10) zajmowali się badaniem właściwości przeciwdrobnoustrojowych olejku z oregano wobec bakterii *Proteus mirabilis*. Już stężenie 200 ppm olejku w podłożu spowodowało ograniczenie wzrostu szczepu o 75% wobec próby kontrolnej i wraz ze wzrostem stężenia zwiększało się jego przeciwbakteryjne działanie.

Bakterie *Salmonella Enteritidis* jedynie w niewielkim stopniu były wrażliwe na działanie ekstraktu alkoholowego i olejku eterycznego (tab. II). Hersch–Martínez i współpr. (11) podjęli próbę określenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych oregano wobec bakterii *Salmonella Enteritidis*. Wielkość stref zahamowania wzrostu dla tych bakterii wynosiła 15 mm. Autorzy (11) określili dodatkowo skład olejku z *Origanum vulgare*, który zawierał: 31,5% tymolu, 25,6% p–cymenu i 16,4% karwakrolu. Są to związki najczęściej wymieniane jako odpowiedzialne za przeciwdrobnoustrojowe właściwości ekstraktów roślinnych.

## WNIOSKI

1. Ekstrakt wodny, alkoholowy oraz olejek eteryczny z oregano charakteryzowała aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec większości badanych bakterii. Można wnioskować, że ekstrakty oraz olejek eteryczny z oregano były źródłem substancji aktywnych, które w różnym stopniu hamowały wzrost i rozwój wybranych szczepów bakterii.

2. Najbardziej skuteczny w hamowaniu wzrostu większości badanych bakterii w metodzie krążkowo–dyfuzyjnej był ekstrakt wodny, a najmniej – olejek eteryczny. Wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów i olejku z oregano mógł mieć użyty surowiec, efektywność procesów otrzymania wyciągów z oregano, a także zawartość składników aktywnych o działaniu antibakteryjnym wobec badanych szczepów.

3. Bakterie Gram-dodatnie wykazały większą wrażliwość na działanie składników aktywnych obecnych w oregano w porównaniu z bakteriami Gram-ujemnymi.

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

E. Hać–Szymańczuk, E. Lipińska, O. Grzegorzółka

ESTIMATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE OREGANO  
(*Origanum vulgare* L.)

## Summary

The aim of the work was to test antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts (water and alcoholic) and essential oil. In the present study, oregano was investigated for activity against *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Tetracoccus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*,

