

»MLADI ZA NAPREDEK MARIBORA«

31. SREČANJE

**RAZISKOVANJE ANTIMIKROBNIH LASTNOSTI TUJE  
(*Thuja occidentalis*) Z DIFUZIJSKIM ANTIBIOGRAMOM**

BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO, ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga

05 d | ~~WWW.SOPSOZAPOU~~

T ^} d | ~~WWW.SOPSOZAPOU~~

¥ [ | ~~WWW.SOPSOZAPOU~~

2014, Maribor

»MLADI ZA NAPREDEK MARIBORA«

31. SREČANJE

**RAZISKOVANJE ANTIMIKROBNIH LASTNOSTI TUJE  
(*Thuja occidentalis*) Z DIFUZIJSKIM ANTIBIOGRAMOM**

BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO, ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO



**2014, Maribor**

### **Zahvala**

*Rada bi se zahvalila svoji mentorici brez katere bi bilo moje raziskovanje neuspešno. Prav tako zahvala gre Centru za mikrobiologijo na Zavodu za zdravstveno varstvo, da so mi omogočili izvedbo poskusa. Nazadnje se zahvaljujem še šolski koordinatorici raziskovalne dejavnosti, ki je poskrbela za mojo dobro obveščenost in objavo naloge.*

## Kazalo vsebine

Zahvala .....	3
1 UVOD.....	5
1.1 Namen raziskovalne naloge.....	5
2 TEORETIČNO OZADJE .....	7
2.1 Tuja ali klek.....	7
2.1.1 Tujon.....	10
2.2. »Naravni« antimikrobiki .....	13
2.3 Izbrani patogeni .....	14
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
2.3.2 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	16
2.3.3 <i>Escherichia coli</i> .....	17
2.3.4 <i>Candida albicans</i> .....	19
2.3.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
3 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM.....	22
3.1 Metoda disk difuzije .....	22
3.2 Uporabljeni ekstrakti .....	22
3.3 Opis poskusa .....	24
3.3.1 Prva ponovitev .....	25
3.3.2 Druga ponovitev .....	29
3.4 Analiza rezultatov .....	33
4 RAZPRAVA.....	36
5 VIRI IN LITERATURA.....	37

# 1 UVOD

## 1.1 Namen raziskovalne naloge

Tuja ali klek (*Thuja occidentalis*) je iglavec, ki ga najdemo v parkih in na pokopališčih, a je v Sloveniji tudi premalo cenjena zdravilna rastlina . V tuji in nekonvencionalni medicini (ruski, homeopatski...) se uporablja za zdravljenje različnih obolenj in naj bi imela celo antibakterijske učinke.

Zato sem se tudi odločila preveriti to trditev. V današnjem času, ko postajajo mikrobi vedno bolj odporni na antibiotike je odkrivanje novih oblik zdravljenja (tudi naravnega) ključnega pomena. Inspiracijo za raziskovanje iščemo v naravi, potem pa izboljšamo že učinkovite snovi in jih pripravimo, da pomagajo človeku.

Namen moje naloge je torej raziskovanje antibakterijskih lastnosti tuje ali kleka skozi disk metodo.

Antibakterijske lastnosti tuje bom preverila na petih patogenih mikroorganizmih za katere bi lahko trdili, da povzročajo najbolj pogoste okužbe (tako nekatere značilno bolnišnične kot tudi zelo trdovratne). Uporabila bom *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* in *Pseudomonas aeruginosa*. Učinek tuje bom preverjala v etanolnem in vodnem ekstraktu skozi metodo difuzijskega disk antibiograma.

Do zdaj je bila na podlagi antimikrobnih lastnosti tuje bila opravljena le raziskava, ki preiskovala učinek etanolnega ekstrakta tuje na navaden prehlad. Rezultati so bili obetavni, saj so kazali da tuja vzpodbuja odpornost imunskega sistema. (povz. po Dr C. Bodinet, Dr B. Naser, Dr M. Tegtmeier, 2005)

Bilo pa je opravljenih tudi nekaj raziskav za potrditev zdravilnih lastnosti tinktur in čajev iz te rastline, ki so imele vse pozitivne rezultate. Toda v svoji nalogi se bom osredotočila le na ekstrakte in njihove učinke na patogene mikroorganizme.

Do pred kratkim (ko so bile z raziskavami te trditve ovržene) pa je tuja veljala za sestavino s psihedelničnimi učinki in je zato premalo raziskana sploh v zdravilnih učinkih, ki jih v tradicionalni medicini uporabljajo že tisočletja.

Zaradi potenciala (tudi že raziskanega) in uporabe te rastline že tisočletja, pričakujem pozitivne rezultate vsaj pri nekaterih mikroorganizmih in ekstraktih. Predvsem pa bi odkritje antibakterijskih lastnosti te rastline pomenilo velik korak pri odkrivanju antibiotikov nove generacije, na katere mnogi patogeni organizmi še niso rezistentni.

Postavila sem si raziskovalno vprašanje:

**Ali imata etanolni in vodni ekstrakta tuje antimikrobne lastnosti na *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* in *Pseudomonas aeruginosa*?**

## 2 TEORETIČNO OZADJE

V tem poglavju bom najprej predstavili samo rastlino (*Thuja occidentalis*) in učinkovino za katero se smatra, da povzroča zdravilne lastnosti (tujon). V nadaljevanju pa bom še na kratko opisala patogene organizme, ki sem jih izbrala za raziskavo (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* in *Pseudomonas aeruginosa*).

### 2.1 Tuja ali klek

Ameriška tuja ali klek (*Thuja occidentalis*) je golosemenka in zimzeleno iglasto drevo iz družine cipres (*Cupressaceae*) za katero uporabljamo tudi ime bela cedra. Je ameriškega izvora pri nas pa ga gojijo v parkih in na pokopališčih.



Slika 1: *Thuja occidentalis*

Drevo ima ploske in pahljačaste veje in njegove iglice so luskaste, v čemer se tudi razlikuje od večine iglavcev. Za rod tuj je značilno tudi rdeče-rjavo ostro lubje. Njegove iglice so dolge od 1 mm do 10 mm. Iglice rastejo v štirih izmenjujočih vrstah okoli vejic. Moški

storži so majhni in locirani na konici vej, medtem ko imajo ženski storži bolj usnjato strukturo in so večji ter locirani bolj v smeri debla kot moški.



Slika 2: Luskaste iglice tuje z moškimi storži

Tuja ima veliko vlogo v ekosistemu v katerega spada. Z njo se hrani jelen in lahko povzroči, kjer je populacija jelenov zelo velika, nastanek sadik (zaradi velike količine objedanja). Na tuji živijo tudi nekatere ličinke metuljev vključno z *Epirrita autumnata*, *Ectropis crepuscularia* in *Eupithecia pusillata*.

Prvi jo je opisal Carl Linnaeus (1753). Ameriški Indijanci plemena Ojibwa jo že stoletja uporabljajo v medicini kot eno glavnih učinkovin v njihovih zdravilih. Je bogata z vitaminom C in bi naj bila celo rastlina s katero so zdravili skorbut – bolezen mornatjev zaradi pomanjkanja vitamina C (vsebuje 50 mg vitamina C na 100 g). Olje iz kleka se je uporabljalo za čistila, razkužila, insekticide. V 19.st. so tinkturo kleka uporabljali za zdravljenje bradavic, oprha in lišaja. Danes se uporablja tudi v konvencionalni zahodni medicini, a le pri zdravljenju oslabele odpornosti (predvsem v čajih in tinkturah, vedno le v kombinaciji z drugimi rastlinami). Čaj iz listov tuje se lahko uporablja tudi za zdravljenje artritisa, lajšanje bolečin v mišicah in celo za vzpodbujanje izkašljevanja pri bronhitisu, prehladu ali drugih respiratornih boleznih. Uporablja se tudi v domači pri preprečevanju virusa Herpes Simplex, tip 1, ki sproža herpes na ustnicah (*herpes labialis*) in za zdravljenje boleznih respiratornega trakta (npr. bronhitis).





Slika 3: Herpes labialis

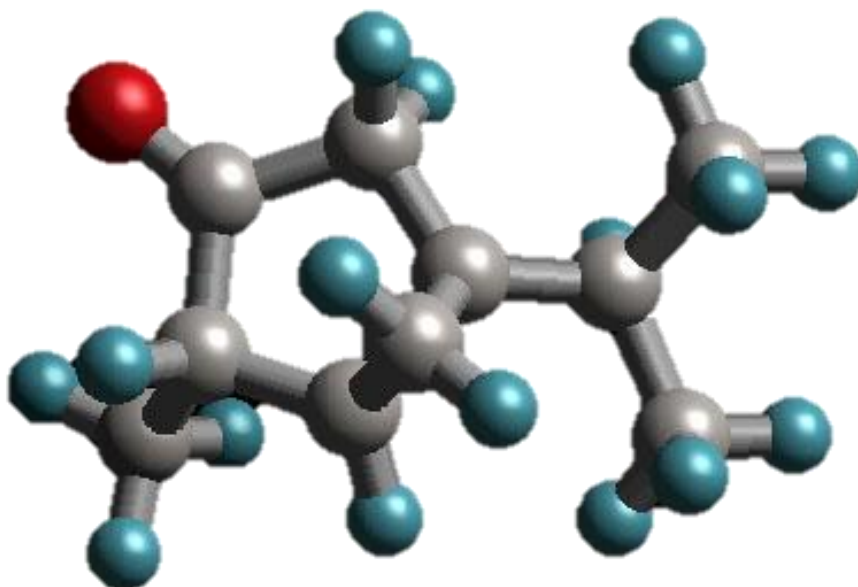
Zelo pomemben je tudi kot rastlina v homeopatski medicini – imela bi naj antibakterijske učinke. Kljub svojim zdravilnim lastnostim se ne uporablja velikokrat zaradi nevarnosti toksičnosti in alergičnih reakcij. Zaradi tega jo tudi velikokrat zamenjajo za olje brinjevca ali ciprese, ki imata podobne zdravilne lastnosti (najverjetneje zaradi vsebnosti tujona). (povz. po Domača Lekarna, 1999, WebMD, 2009 in Annie's Remedy, 2014)



Slika 4: Tinktura kleka

### 2.1.1 Tujon

Tujon je molekula značilna za klek in samo še nekaj drugih rastlin (žajbelj, cipresa, žajbelj...) in je najverjetneje tudi razlog za njegove zdravilne učinke, saj je redka in še relativno neraziskana molekula z zanimivo kemijsko zgradbo.



Slika 5: Molekula tujona

Tujon je naravni produkt. Baze okusa zelišč in sadja, antibiotiki iz plesni in toksični alkaloidi so vsi primeri naravnih produktov. Toda le ti so redko koristni samemu organizmu in so ustvarjeni v procesu sekundarnega metabolizma. V kontrastu s tem pa so velikokrat lahko v korist človeku (kot v primeru tujona), predvsem v medicini.

Tujon (Thujone) je keton kar pomeni, da ima kemijsko strukturo  $RC(=O)R$  (na ogljikov atom vezan kisik z dvojno vezjo). Tujon pa je tudi terpen (monoterpen). Ti so poimenovani po terpentinu. Olja teh rastlin so pogosto dišeča in okusna in se imenujejo esencialna olja. Za monoterpene je značilna zgradba iz dveh izoprenskih enot ( $C_{10}H_{16}$ ). Tujon spada med ciklične oblike monoterpenov, saj molekula vsebuje »krog« iz ogljikov.

Najbolj je znan po svoji prisotnosti v alkoholni pijači pelinkovec (ang. absinthe), ki naj bi imel psihedelične učinke. Na veliko so ga zlorabljali pariški umetniki v začetku 20. st.



Slika 6: Pijača pelinkovec

Tujon učinkuje na GABA receptorje v možganih in tako (v prevelikih količinah) povzroča halucinacije, čeprav je bilo leta 2008 dokazano, da tako v tako majhnih koncentracijah v katerih se pojavlja v pelinkovcu, ne more povzročati prej omenjenih učinkov. Na mit je v preteklosti vplivala tudi raziskava v 70. letih 20. stoletja, ko so odkrili, da ima tujon podobno kemično zgradbo kot THC (psihoaktivna snov, ki jo najdemo v marihuani).

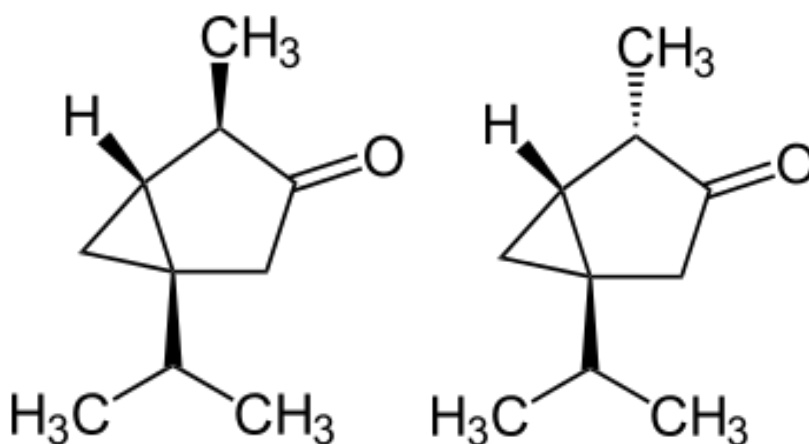
Tujon je bil tudi odkrit v povezavi prav s pelinkovcem. Sredi 20. st. ga je odkril Dr. Valentin Magnan, ki je raziskoval alkoholizem. Čeprav je odkril to molekulo v pelinovem olju je napačno sklepal, da le ta povzroča halucinacije v njegovih poskusih na živalih. Njegovi poskusi so bili vzrok za omejitve/prepovedi te sestavine v veliko državah.

Tujon je dokazano toksičen za možgane, ledvice in jetra in lahko v velikih dozah povzroči konvulzije (krče). V farmacevtske namene se uporablja izključno v herbalni medicini (homeopatska, ruska...). Ekstrakt kleka (ki vsebuje tujon) naj bi vzpodbujal imunski sistem ter v redkih primerih odpravljal bolečine. Študije iz leta 2005 so pokazale tudi sposobnost zdravljenja navadnega prehlada. Znani stranski učinki so nespečnost in anksioznost kar dokazuje vpliv na centralni živčni sistem.

V evropski uniji so regulacije za vsebnost tujona naslednje:

- 0,5 mg/kg v hrani, ki ni pripravljena z žajbljem in v brezalkoholnih pijačah
- 10 mg/ kg v alkoholnih pijačah (ki ne vsebujejo rastlinskih vrst s tujonom)
- 25mg/ kg v hrani pripravljene z žajbljem
- 35 mg/kg v alkoholnih pijačah (ki vsebujejo rastlinskih vrst s tujonom)

Tujon se v naravi nahaja v dveh oblikah in sicer (-)- $\alpha$ -tujone in (+)- $\beta$ -tujone.



Slika 7: (-)- $\alpha$ -tujone in (+)- $\beta$ -tujone

Tabela 1: Kemijske in fizikalne lastnosti tujona

Formula	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O
Molekulska masa	152.23 g/mol
Gostota	0.92 g/cm <sup>3</sup> ( $\beta$ -tujone)
Vrelišče	201 °C ( $\beta$ -tujone)

(povz. po Biology of microorganisms, 2013 in Wikipedia, 2014)

Tujon ni topen v vodi – samo v etanolu, dietil etru in kloroformu (kar tudi vpliva na ugotavljanje antibakterijskih lastnosti v različnih raztopinah). Zaradi te njegove lastnosti omogoča zelo preprosto ugotavljanje ali je prav tujon tista učinkovina, ki v tuji povzroča antibakterijske učinke. Ker bom v svojem poskusu ugotavljala antibakterijske lastnosti tako vodnega kot etanolnega ekstrakta, bom v primeru da je ekstrakt učinkovit samo v etanolni raztopini in ima večji učinek kot samo etanol, lahko zaključila, da ima tujon gotovo vlogo v zdravljenosti tuje.

## 2. 2. »Naravni« antimikrobiki

*»Antibiotiki so učinkovine, ki zavirajo rast bakterij (tj. delujejo bakteriostatično) ali izzovejo njihovo smrt (tj. delujejo bakteriocidno). Strukturno so raznovrstne spojine (npr. poliketidi, beta laktami, lipopeptidi, aminoglikozidi, in drugo). Vsi sodijo med t.i. sekundarne metabolite, organske spojine, ki niso bistvene za rast, razvoj ali razmnoževanje organizma, a mu zagotavljajo določeno preživetveno prednost.« (Bratkovič T., 2013)*

Pred 20. st. je bilo zdravljenje infekcij sestavljeno izključno iz naravnih učinkovin najdenih v različnih rastlinah. Čeprav so jih uspešno uporabljali že tisočletja, nihče ni vedel kaj povzroča njihovo uspešnost. Nato pa je leta 1928 Alexander Fleming (po naključju) odkril penicilin na gojišču, ki ga je pomotoma okužil s plesnijo. (povz. po M. Bellis, 2014)



Slika 8: Alexander Fleming

Od takrat dalje se antibiotiki množično uporabljajo za zdravljenje raznih bakterijskih okužb. Poznamo antibiotike širokega in ozkega spektra. Toda ravno zaradi množične uporabe antibiotikov smo povzročili vedno večjo rezistenco bakterij – vplivali smo na njihove evolucijske prilagoditve na okolje.

*»Odpornosti proti bakterijam ne moremo preprečiti, lahko pa pojav odložimo z razvijanjem novih učinkovin z novimi mehanizmi delovanj in z ustrezno rabo obstoječih.*

*Bakterije lahko odpornost proti antibiotikom pridobijo z naključnimi mutacijami (če pride do spremembe tarče antibiotika) ali s prenosom genske informacije med osebki, ki niso v odnosu predniki – potomci na proteine, ki razgrajujejo ali kemijsko spreminjajo antibiotike oziroma jih aktivno črpajo iz bakterijske celice. Odpornost bakterij se razmahne ob selekcijskem pritisku – če antibiotike uporabljamo za neprimerne indikacije (npr. pri zdravljenju virusnih okužb), uporabljamo prenizke odmerke ali prezgodaj zaključujemo z zdravljenjem okužb.» (Bratkovič T., 2013)*

Iz teh razlogov je izjemno pomembno da odkrivamo vedno nove vrste antimikrobikov in tako prehitimo razvijanje rezistenco bakterij. Zglede za nova zdravila znanstveniki velikokrat iščejo v naravi, kjer ne primanjkuje produktov sekundarnega metabolizma (kot v primeru tuje), ki lahko imajo antibakterijske lastnosti.

Danes večino novih antibiotikov odkrivajo z računalniškimi programi, ki simulirajo reakcijo med novim zdravilom in tarčo. Kljub tej novi in zelo hitro metodi, se danes v neki meri še odkriva nove antibiotike tako, da izoliramo organizme iz narave za katere sumimo, da proizvajajo antibiotične snovi (kot bom to storila pri tuji). Nato učinkovanje proizvedenih snovi preverimo z metodo disk difuzijskega antibiograma. Izbrane bakterije so predstavniki ali sorodniki skupine mikrobov proti katerim bi se antibiotik uporabljal. Če so rezultati vzpodbudni se raziskava nadaljuje do razvitja novega zdravila.

Poleg ekstrakta tuje (za katero so antimikrobne lastnosti znanstveno še nepotrjene) veljajo za naravne antibiotike tudi esencialno olje mete, čajevca, origana, limonovca, timijana in evkaliptusa ter razni ekstrakti drugih rastlin (na primer česna). (povz. po WiseGEEK, 2013 in Biology of microorganisms, 2013)

### **2.3 Izbrani patogeni**

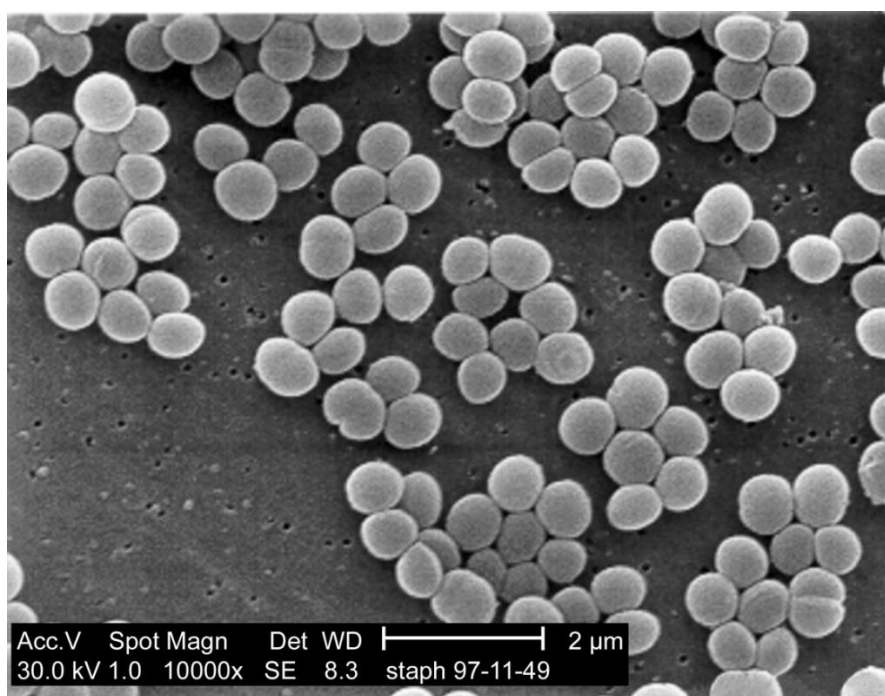
Antibakterijske lastnosti tuje bom preizkusila na naslednjih bakterijah:

1. *Staphylococcus aureus*,
2. *Enterococcus faecalis*,
3. *Escherichia coli*,
4. *Candida albicans* in
5. *Pseudomonas aeruginosa*

Za te mikroorganizme sem se odločila, ker so ene najpogostejših in tudi povzročajo največ težav. Za glivo *Candida albicans* celo ni antimikotika. Iz teh razlogov bi bilo odkritje občutljivosti teh bakterij na izvleček tuje zelo pomembno.

### 2.3.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* oz. zlati stafilocok je anaerobna bakterija s premerom približno 1  $\mu\text{m}$ , ki pri človeku povzroča različne okužbe. Stafilokoki so zelo razširjeni v naravi, najpogosteje pa jih najdemo na sluznični membrani sesalcev in ptic. Najdemo jo tudi v hrani, kjer lahko povzroča razne zastrupitve z živili. V hrani zastrupitve povzročajo tiste vrste *S. aureus*, ki izločajo toksine (enterotoksine). Le ti pri obolelem izzovejo bruhanje in drisko.



Slika 9: *Staphylococcus aureus*

Najdemo ga tako rekoč vsepovsod (v zraku, prahu, vodi, odplakah, različnih površinah, tudi kuhinjskih opremi, strojih ...). Je zelo odporen na spremembe temperature in pomanjkanje vode. V živilih ga lahko uničimo s pasterizacijo.

Več kot 50% zdravih posameznikov je nosilcev *S. aureusa*, čeprav ne kažejo znakov okužbe vendar povzročitelje bolezni vseeno izločajo iz telesa. (povz. po IVZ, 2012 in Bannerman in Peacock, 2007)

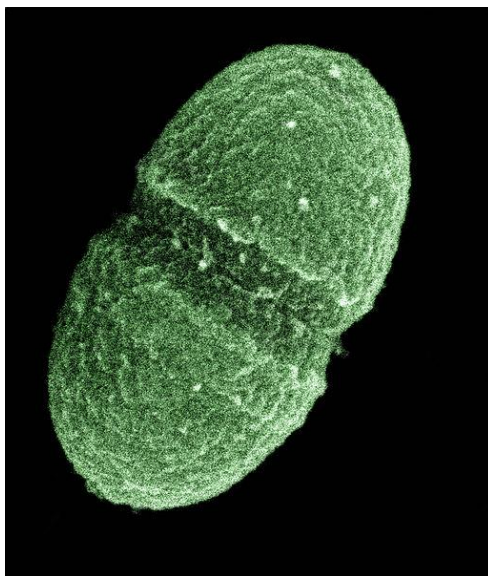
Pojav te bakterije sega vse od kože, mehkega tkiva, respiratornega sistema, kosti, sklepov, žil in ran. Raste v parih ali gručah.

*Staphylococcus aureus* se zdravi s penicilinom, a je rezistenca nanj vedno bolj pogosta (do leta 1960 je bila odpornost kliničnih izolatov že 80%). Rezistenca se je začela pojavljati že pred letom 1950, saj je bil *Staphylococcus aureus* eden prvih bakterij, ki so jih zdravili. Danes je *S. aureus* odporen na veliko različnih antibiotikov in le 2% izolatov ni odpornih na penicilin. Tako se za zdravljenje te bakterije uporablja methicillin, oxacillin, cloxacillin, in flucloxacillin. (povz. po Wikipedia, 2014)

### 2.3.2 *Enterococcus faecalis*

Enterokoki so del normalne človeške in živalske črevesne flore ampak so tudi patogen odgovoren za veliko resnih okužb. Težave pa začne povzročati, ko se zmanjša človekova odpornost in se bakterija raznese po telesu. Pred uvrstitvijo enterokokov v svoj red so pripadali redu streptokokov. V zadnjem času se rezistenca enterokokov povečuje in jih je tudi vedno težje zdraviti. Za razliko od streptokokov je rezistenca na penicilin pri enterokokih še bolj pogosta. Rezistenca se je začela pojavljati okoli leta 1978.

*Enterococcus faecalis* je aorobna bakterija, ki lahko preživi in raste v zelo raznovrstnih okoljih. Raste lahko v temperaturah od 10°C pa do 45°C, preživi pa temperature tudi do 60 °C.



Slika 10: *Enterococcus faecalis*



Najpogosteje je infekcija z *Enterococcus faecalis* bolnišnična. Po navadi so to okužbe urinarnega trakta, okužbe ran (nastalih med operacijo, opekline, odprte rane...). Je tudi zelo pogosti povzročitelj endokarditisa in sepstičnih okužb. Ima tudi svosobnost vezave na dentin in tako povzroča okužbe skozi zobne kanale. Nekoliko redkeje povzroča okužbe respiratornega trakta. (povz. po S. L. Fraser, 2012 n *Biology of microorganisms*, 2013)

### **Izbrani antibiotik: Linezolid**

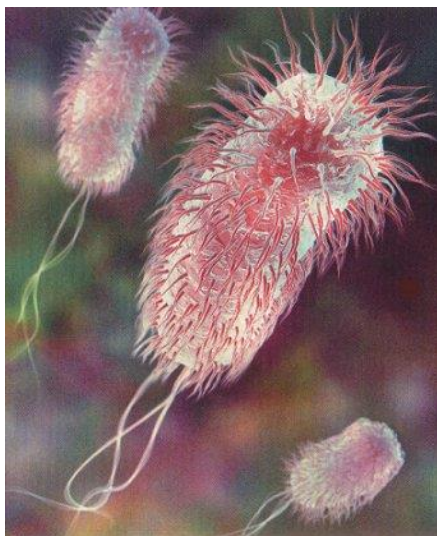
Linezolid je antibiotik, ki se uporablja proti Gram-pozitivnim bakterijam. V glavnini se uporablja za zdravljenje okužb kože, mehkih tkiv in predvsem za bolnišnične pljučnice. Efektiven je tudi proti *Enterococcus faecalis*. Bil je odkrit komaj v prejšnjem desetletju kar je tudi eden izmed razlogov, da je rezistenca nanj še izjemno redka.

Po CLSI M100-S24 (Clinical and Laboratory Standard Institute ) mora biti inhibicijska cona izmerjena pri antibiogramu 20.5-22.5 mm, da lahko trdimo da sev ni rezistenten na Linezolid . S to cono bom kasneje tudi primerjala izmerjene cone pri ekstraktu tuje.

### **2.3.3 *Escherichia coli***

»*E. coli* je anaerobna bakterija, ki živi v črevesju ljudi in živali, razširjena pa je tudi povsod, kjer pride do onesnaženja z iztrebki (fekalno onesnaženje npr. vode, zemlje, živil). Poznamo različne podtipе *E. coli*. Glede virulentnosti jih razvrščamo na nevirulentne in virulentne seve (virulenca je sposobnost mikroorganizma povzročiti bolezen). Nevirulentni sevi so del normalne črevesne flore. Virulentni sevi povzročajo okužbe v prebavilih in zunaj črevesne okužbe pri ljudeh in živalih. Nekatere vrste *E. coli* izločajo toplotno stabilne in toplotno nestabilne strupe (toksine). Bakterije rastejo pri temperaturi od 25,5 °C do 45,5 °C (optimalna temperatura za rast in razmnoževanje je 37 C). Nekatere vrste rastejo tudi v kislih živilih (pH 4,4 in manj).« (IVZ, 2010)

*E.coli* pripada skupini enteričnih bakterij, katerih skupni značilnosti sta majhna potreba po hranilnih snoveh in fermentacija sladkorjev v rane končne produkte. Čeprav je ta bakterija ena najbolj znanih in raziskanih na svetu, jo je z genomom zelo težko identificirati, saj si z drugimi enteričnimi bakterijami deli veliko večino genoma. Zato *E.coli* ov laboratoriju določijo z različnimi identifikacijskimi testi, ki med drugim iščejo značilne proteine in gene, ki jih najdemo izključno v tej bakteriji.



Slika 11: *E. coli*

*Escherichia coli* (poimenovana po njenem odkritelju) se pogosto uporablja v mikrobioloških raziskavah, saj je znan njen celoten genom. V biotehnologiji se uporablja za pridobivanje inzulina, aminokislin in drugih biotehnoloških produktov. (povz. po Wikipedia, 2014 in Biology of microorganisms, 2013)

Raziskava iz leta 2002 na Food and Drug Administration v Marylandu je pokazala rezistenčnost *E. coli* na tetracyclin, sulfonamide, streptomycin in ampicillin ter nekaj novejših antibiotikov. Živalski izolati so bili bolj rezistenčni kot človeški. Najpogostejša klinična rezistenčnost pa je na tetracyclin in streptomycin.

### **Izbrani antibiotik: Ciprofloksacin**

Ciprofloksacin je antibiotik, ki se uporablja predvsem proti Gram-negativnim bakterijam (kot *Escherichia coli*). Lahko je del zdravljenja v kombinaciji z drugimi antibiotiki in ga večkrat uporabijo proti še neidentificiranim patogenom kot antibiotik širokega spektra predvsem za okužbe urinarnega trakta. V klinično uporabo je prišel v poznih 90. Letih prejšnjega stoletja. (povz. po European Association of Urology, 2010)

Po CLSI M100-S24 (Clinical and Laboratory Standard Institute) mora biti inhibicijska cona izmerjena pri antibiogramu 15.5-20.5 mm, da lahko trdimo da sev ni rezistenten na ciprofloksacin. S to cono bom kasneje tudi primerjala izmerjene cone pri ekstraktu tuje.

### 2.3.4 *Candida albicans*

*C. albicans* je diploidna gliva, ki živi v človeškem telesu in jo najdemo v 80% ljudi. Naseljuje prebavni trakt, debelo črevo in usta. Je pogost povzročitelj oralnega in vaginalnega oprha (tuja naj bi zdravila oprh!). Je lahko ozdravljiva za ljudi z normalno delujočim imunskim sistemom in z njo hitreje obolevajo ljudje z šibkim imunskim sistemom za katere je lahko kandidoza tudi smrtna.

Pojavlja se v dveh različnih fenotipih, ki ju lahko tudi zamenja; monocelični obliki ali v nitastih strukturah. (povz. po Scott Foss, 2013)



Slika 12: *Candida albicans* na gojišču

Rezistentni patogeni so se začeli pojavljati okoli leta 1885 in postajali vedno pogostejši. Danes ne poznamo antimikrobika, ki bi lahko uničil *Candida albicans* (povz. po T. White, S. Holleman, F. Dy, L. Mirels, D. Stevens, 2002 in *Biology of microorganisms*, 2013)

V svoji raziskavi bom jo uporabila, saj me zanima učinek tuje ne le na bakterije, ampak tudi na glive, ki povzročajo bolezni pri človeku.

#### **Izbrani antibiotik**

Kot sem omenila že prej, proti *Candida albicans* ne uporabljamo nobenega antibiotika, saj je rezistentna na vse znane antimikrobike. Zato tudi v svojem antibiogramu *Candide albicans* za primerjavo ne bom uporabila nobene antibiotične kontrole.

### 2.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je pogosta aerobna bakterija, ki lahko povzroči bolezni pri živalih, vključno s človekom. Najdemo jo v zemlji, vodi, na koži in večini okolij po vsem svetu. Uspeva ne le v normalnih atmosferah, ampak tudi v atmosferah z malo vsebnostjo kisika in lahko kolonizira številna naravna in umetna okolja.

Za hrano ima širok spekter organskih snovi. Pri živalih ji to omogoča, da okuži ranjena tkiva po vsem telesu in osebe z oslabljenim imunskim sistemom. Simptomi takih okužb so razna vnetja in sepsa. Če se takšne kolonije pojavijo v vitalnih človeških organih kot so pljuča, sečila in ledvice, je lahko okužba usodna. Povzroča pljučnico, sepso, okužbe sečil, gastrointestinalne okužbe ter okužbe mehkih tkiv in sluznic. Je najbolj pogosta bakterija, ki povzroča vnetje zunanjšega ušesa in opeklina. Ker bakterija uspeva na vlažnih površinah, je pogosta na medicinski opremi (vključno s katetri), zaradi česar prihaja do veliko okužb v kliničnem okolju. Prav tako je sposobna razgrajevati ogljikovodike in jo uporabljajo za razgrajevanje nekaterih sestavin v olju ob razlitjih nafte. Leta 2013 ob poletu v vesolje, ki ga izvedla NASA, ugotovili, da ta bakterija v vesolju tvori (ob drugačnih gravitacijskih pogoji) poseben oblike kolonij.



Slika 13: *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je naravno rezistentna na veliko večino antibiotikov in po navadi je najbolj učinkovit način zdravljenja zdravljenje z bakteriofagi v kombinaciji z antibiotiki, ki se v laboratorijskem vzorcu pokažejo učinkovite za specifičnega pacienta kot so prvič opisali v Journal Clinical Otolaryngology leta 2009. Rezistenčnost te bakterije se je začela pojavljati okoli leta 1965. (povz. po Wikipedia, 2014 in Biology of microorganisms, 2013)

### **Izbrani antibiotik: Ceftazidim**

Čeprav Ceftazidim spada med antibiotike širokega spektra se po navadi uporablja izključno za zdravljenje okužbe z bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*. Toda prvič so ga uporabili za zdravljenje redke tropske bolezni melioidoze. (povz. po White NJ, 2003)

Po CLSI M100-S24 (Clinical and Laboratory Standard Institute ) mora biti inhibicijska cona izmerjena pri antibiogramu 14.5-17.5 mm, da lahko trdimo da sev ni rezistenten na antibiotik. S to cono bom kasneje tudi primerjala izmerjene cone pri ekstraktu tuje.

### **3 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM**

Po raziskavi literature, ko sem spoznala nekatere zdravilne lastnosti, ki naj bi jih imela tuja, sem si pred poskusom postavila naslednjo hipotezo:

**Tuja vsebuje učinkovine, ki imajo protimikrobne lastnosti.**

Za preverjanje te hipoteze sem uporabila metodo difuzijskega antibiograma (opisano v naslednjem poglavju).

**Neodvisna spremenljivka: koncentracija in vrsta ekstrakta tuje**

**Odvisna spremenljivka: inhibicijska cona na antibiogramu**

#### **3.1 Metoda disk difuzije**

Standardni postopek za ugotavljanje antimikrobnih sposobnosti neke snovi je metoda disk difuzije. Na agar se enakomerno nanese definirana gostota koncentrirane kulture (ki je bila prej posebej homogenizirana v epruveti v primerni tekočini). Nato filtrirne papirne diske, prepojene s snovjo z domnevnimi antibakterijskimi lastnostmi položimo na agar. Po specifični inkubacijski dobi izmerimo polmer inhibicijske cone okoli papirnatega diska. (povz. po Biology of microorganisms, 2013)

#### **3.2 Uporabljeni ekstrakti**

Za preverjanje antimikrobnih lastnosti smo uporabili različne ekstrakte tuje. Z rastline smo odrezali zelene iglice in jih narezali na kosce velike od 1-5mm. Za ekstrakte smo uporabili destilirano vodo in 70% etanol. Iz lastnosti tujona, da ni topen v vodi smo lahko razlikovali delovanje tujona od drugih sestavin. Za prvo ponovitev poskusa smo pripravili:

1. Vodni ekstrakt: 3,00 g razrezanih iglic smo 5 minut kuhali v 100 ml vrele vode in ga nato prefiltrirali, da ne bi vseboval bakterij, ki bi vplivale na poskus.
2. Etanolni ekstrakt: 3,00 g razrezanih iglic smo dodali 100 ml 70% etanola in nato ekstrakt 2 uri imeli na stresalni napravi.
3. Čisti ekstrakt: Tujo smo razrezali v mešalniku in iztisnili čisti ekstrakt, ki smo ga kasneje tudi filtrirali.
4. Etanol: V antibiogramu smo uporabili tudi 70% alkohol, saj smo želeli primerjati učinek 3. ekstrakta z učinkom samo etanola.



Slika 14: Etanolni ekstrakt na stresalni napravi

V drugi ponovitvi poskusa smo uporabili naslednje nekoliko drugačne ekstrakte, ki so sovpadali z rezultati prvega poskusa:

1. 3,00 g razrezanih iglic tuje smo zmešali z 100 ml 70% alkohola in postavili na stresalno napravo in ga prefiltrirali.
2. 6,00 g razrezanih iglic tuje smo zmešali z 100 ml 70% alkohola in postavili na stresalno napravo in ga prefiltrirali.
3. 9,00 g razrezanih iglic tuje smo zmešali z 100 ml 70% alkohola in postavili na stresalno napravo in ga prefiltrirali.
4. 9,00 g razrezanih iglic tuje smo zmešali z 100 ml 70% alkohola in postavili na stresalno napravo in ga nismo prefiltrirali.
5. Različni antibiotiki, ki se v praksi uporabljajo proti izbranim patogenom (opisani v poglavju o mikroorganizmih)

### 3.3 Opis poskusa

Ko smo pripravili ekstrakte in jih prefiltrirali, smo poskus izvedli v specializiranem laboratoriju. V poskusu so bili potrebni naslednji pripomočki, naprave in snovi:

- Luskaste iglice tuje,
- 70% etanol,
- destilirana voda,
- erlenmajerice,
- parafin,
- stresalna naprava in magnetna kapsula,
- filtrirni papir,
- pinceta,
- etanol in plinski gorilnik (za razkuževanje),
- Mueller-Hinton gojišče za testiranje občutljivosti,
- papirnati diski (premer 10,00 mm)
- *Staphylococcus aureus* (kultura),
- *Enterococcus faecalis* (kultura),
- *Escherichia coli* (kultura),
- *Candida albicans* (kultura)
- *Pseudomonas aeruginosa* (kultura),
- izbrani antimikrobiki,
- kljunasto merilo ( $\pm 0,01$  mm) in
- inkubator.



### 3.3.1 Prva ponovitev

Potem, ko smo pripravili hranilne agarje s kulturo in z izbranimi ekstrakti in etanolno kontrolo (na papirnih diskih) smo jih 48 ur pustili v inkubatorju na 37°C (da smo simulirali pogoje v človeškem telesu). Po inkubacijskem času smo s kljunastim merilom ( $\pm 0,01$  mm) izmerili premere inhibicijskih con, ki so nastale okoli diskov prepojenih z ekstrakti. Te cone pomenijo do kakšne mere tuja dejansko zavira rast patogenih organizmov. Večja kot je inhibicijska cona, bolj učinkovite so antibakterijske lastnosti (čeprav podatkov ne moremo primerjati s standardiziranimi kot lahko to počnemo pri antibiotikih, saj še podobnih raziskav ni bilo opravljenih). Spodnja preglednica vsebuje izmerjene podatke.<sup>1</sup>

Polja, ki so prazna predstavljajo negativen odziv na ekstrakt in jih zaradi minimalnega premera cone, nismo merili.

Tabela 2: Inhibicijske cone pri različnih vrstah ekstraktov in etanolni kontroli

	cona z ekstraktom 3 g iglic v 100 ml etanola (mm)	cona z ekstraktom 3 g iglic v 100 ml vode (mm)	cona s tekočino iz zmetih iglic (mm)	cona s 70% etanolom (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	/	/	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	17,50	/	/	14,65
<i>Escherichia coli</i>	16,60	/	/	13,74
<i>Candida albicans</i>	15,80	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/	/	/

Sledeče fotografije so bile posnete ob merjenju inhibicijskih con po 48 urah inkubiranja. Številke označene na petrijevkah pomenijo naslednje:

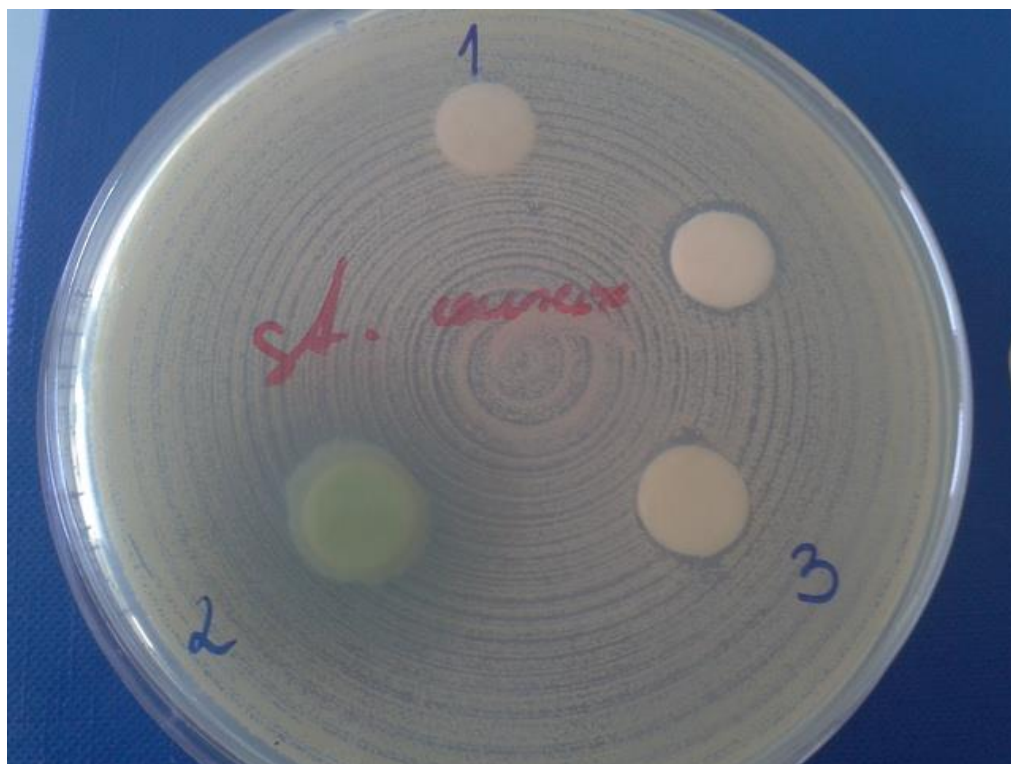
<sup>1</sup> Vsi ekstrakti so podrobneje opisani v prejšnjem poglavju

1 – vodni ekstrakt

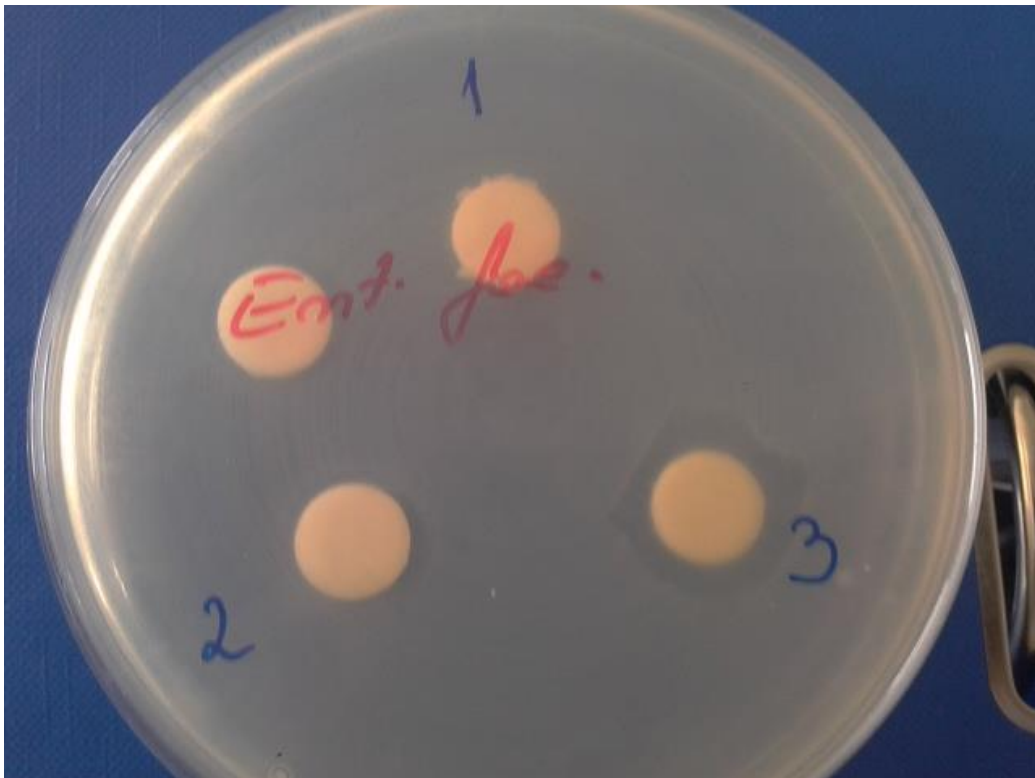
2 – čisti ekstrakt

3 – etanolni ekstrakt

Neoštevilčeno – etanolna kontrola



Slika 15: Petrijevka s *Staphylococcus aureus*



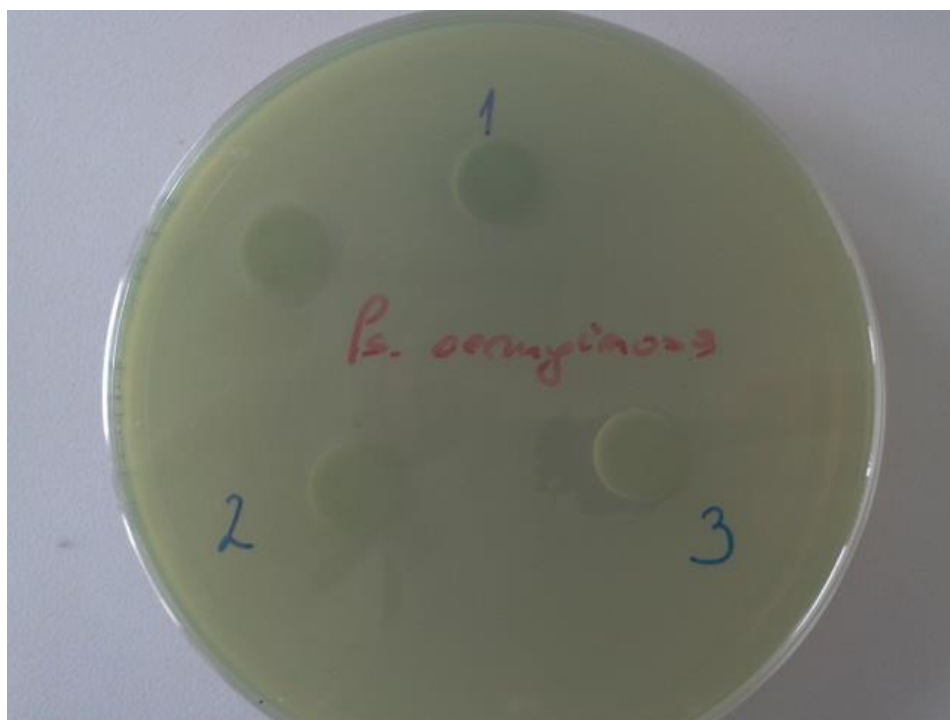
Slika 16: Petrijevka z *Enterococcus faecalis* – inhibicijska cona je opažena ob tretjem ekstraktu



Slika 17: Petrijevka z *Escherichia coli* – Inhibicijska cona pri tretjem ekstraktu je večja kot cona pri kontroli etanola



Slika 18: Petrijevka z *Candida albicans* – inhibicijska cona je nastala okoli tretjega ekstrakta



Slika 19: Petrijevka z *Pseudomonas aeruginosa* – inhibicijska cona okoli tretjega ekstrakta je nesimetrična

### 3.3.2 Druga ponovitev

Zaradi uspešnosti etanolnega ekstrakta tuje smo nadaljevali eksperimentiranje z drugo ponovitvijo. Uporabili smo izključno etanolne ekstrakte, a v različnih koncentracijah, saj smo želeli izvedeti, če koncentracija učinkovin, ki se nahajajo v tuji vpliva na antibakterijske lastnosti etanolnega ekstrakta. Poskus smo zasnovali z ekstrakti opisanimi v prejšnjem poglavju. Uporabili smo tudi nefiltriran ekstrakt, da bi ugotovili, če filtracija vpliva na antibakterijsko učinkovitost ekstraktov. Da bi lahko na koncu primerjali nastale inhibicijske cone z tistimi, ki nastanejo ob zdravljenju, ki se dejansko uporabljajo proti tem patogenim organizmom, smo hkrati v petrijevko dali inkubirati tudi diske z antibiotiki.<sup>23</sup> Spodnja preglednica prikazuje izmerjene inhibicijske cone po drugi ponovitvi poskusa z enakimi bakterijami, a drugačnimi koncentracijami ekstrakta tuje in z kontrolo z antibiotiki.<sup>4</sup>

Tabela 3: Inhibicijske cone pri različnih koncentracijah tuje v etanolnem ekstraktu

	cona s 3 g iglic v 100 ml etanola (mm)	cona s 6 g iglic v 100 ml etanola (mm)	cona z 9 g iglic v 100 ml etanola (mm)	cona z 9 g iglic v 100 ml etanola (nefiltrirano) (mm)	Antimikrobik
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,61	11,97	13,43	13,08	pozitivno
<i>Enterococcus faecalis</i>	13,60	12,13	13,85	11,74	/
<i>Escherichia coli</i>	15,24	12,60	13,85	12,09	pozitivno
<i>Candida albicans</i>	12,75	15,67	14,00	13,69	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,97	16,36	12,46	/	pozitivno

<sup>2</sup> Izbrani in uporabljeni antibiotiki so opisani v poglavju o vsakem mikroorganizmu

<sup>3</sup> Kjer je v preglednici pod antimikrobikom prazno polje, nismo uporabili antibiotika za kontrolo

<sup>4</sup> Kjer je v preglednici pod antimikrobikom napisano »pozitivno« pomeni, da je bila izmerjena vrednost znotraj standardizirane cone in je ta sev ni rezistenten na ta antimikrobik.

Sledeče fotografije so bile posnete ob merjenju inhibicijskih con po 48 urah inkubiranja. Številke označene na petrijevkah pomenijo naslednje:

- 1 – 3 g iglic v 70% etanolu
- 2 – 6 g iglic v 70% etanolu
- 3 – 9 g iglic v 70% etanolu
- 4 – 9 g iglic v 70% etanolu (nefiltrirano)
- 5 – antimikrobik (če je bil uporabljen)



Slika 20: Petrijevka s *Staphylococcus aureus*



Slika 21: *Enterococcus faecalis*



Slika 22: *Escherichia coli*



Slika 23: *Candida albicans*



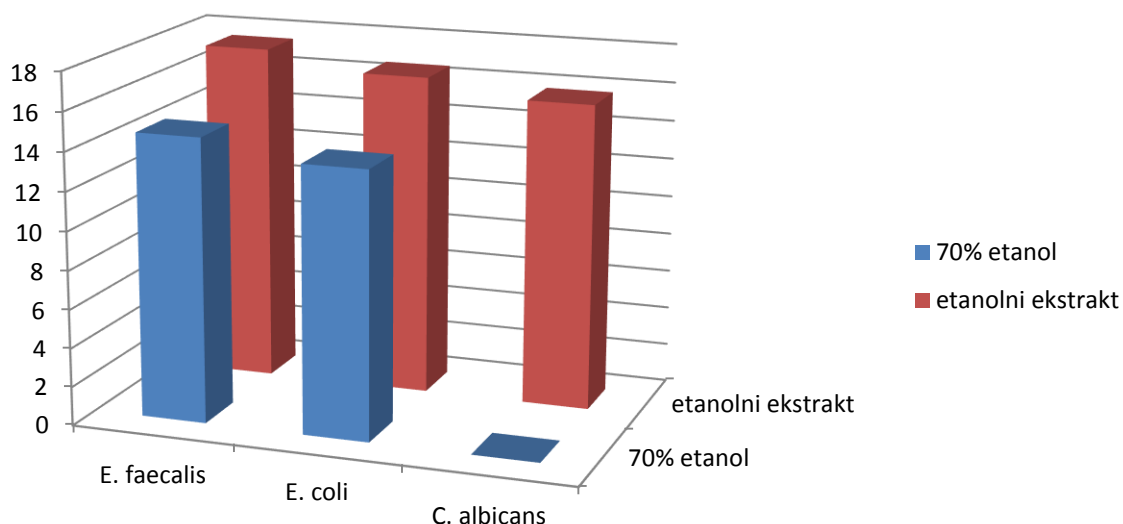
Slika 24: *Pseudomonas aeruginosa*



### 3.4 Analiza rezultatov

V prvi ponovitve poskusa smo ugotavljali le katera vrsta ekstrakta je najbolj učinkovita. Izkazalo se je, da je to etanolni ekstrakt (le na tem ekstraktu so se pokazale večje inhibicijske cone). Pomembna ugotovitev pri tem je, da etanolna kontrola, ki smo jo uporabili, ni imela enako velike inhibicijske cone kot etanolni ekstrakt. Iz tega dejstva lahko sklepamo, da učinek etanolnega ekstrakta na mikrobo ne povzročil sam etanol v raztopine, ampak tudi same učinkovine v tuji.

Grafikon 1: Primerjava inhibicijske cone etanolnega ekstrakta in etanolne kontrole v prvi ponovitvi pri odzivnih mikrobih (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) (mm)



V drugi ponovitvi poskusa pa smo preverjali, če koncentracija tuje vpliva na antimikrobne lastnosti in na katere patogene mikroorganizme ima največji vpliv.

Pri bakteriji *Staphylococcus aureus* koncentracija tuje v etanolu ni premo sorazmerno vplivala na premer inhibicijskih con (s tem na antimikrobni učinek), čeprav je bil najbolj uspešen najbolj koncentriran ekstrakt (tako filtriran, kot nefiltriran).

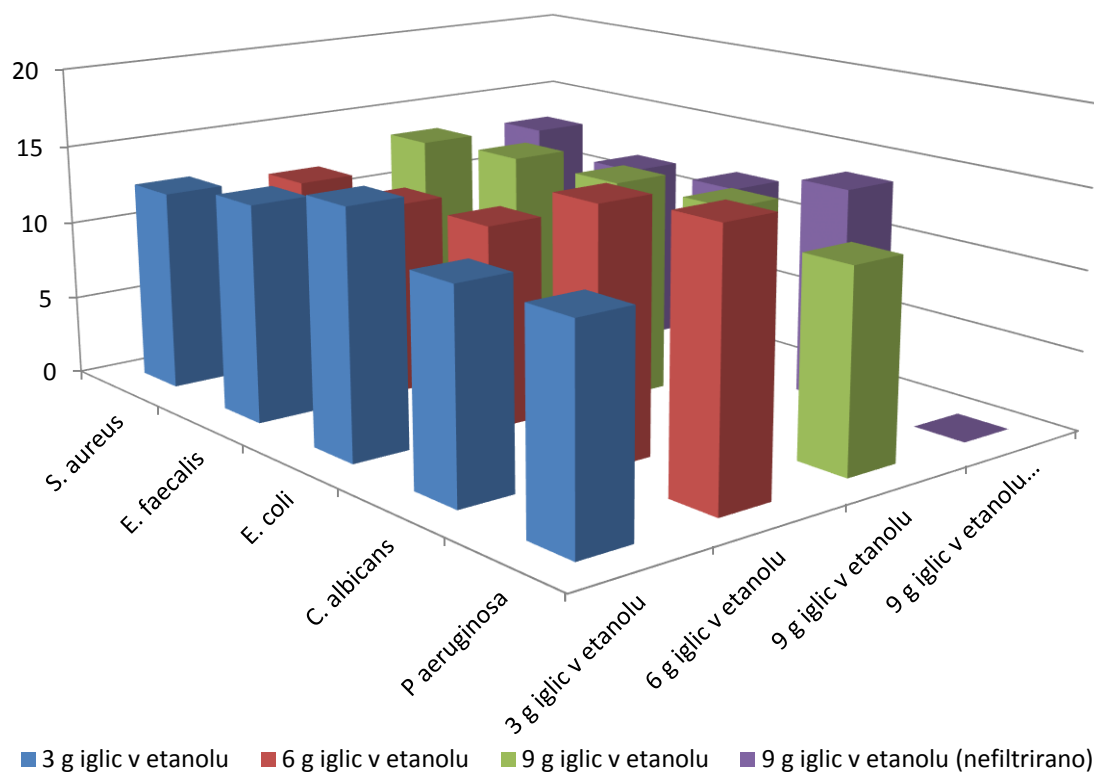
Pri bakteriji *Enterococcus faecalis* koncentracija tuje prav tako ne vpliva premo sorazmerno na premer inhibicijskih con, a za razliko od prejšnje bakterije je tu filtracija ekstrakta povzročila zmanjšanje učinkovitosti ekstrakta. Tako lahko sklepamo, da na to bakterijo vplivajo učinkovine, ki so bile prefiltrirane.

Poskus na *Escherichia coli* je prav tako pokazal, da koncentracija ne vpliva na velikost inhibicijskih con, filtracija pa zmanjša učinkovitost etanolnega ekstrakta. Za razliko od prejšnjih dveh bakterije bil učinek ekstrakta večji pri najnižji koncentraciji treh gramov iglic na 100 ml 70% etanola (pri prvih dveh je učinek največji pri najvišji koncentraciji devetih gramov iglic na 100 ml 70% etanola).

Pri *Candida albicans* smo s poskusom izvedeli, da je etanolni ekstrakt tuje učinkovit antimikotik za to glivo (trenutno ni znanega zdravila, ki bi vsaj oviral rast te glive). Največji učinek se je pokazal pri srednji koncentraciji šestih gramov na 100 ml 70 % etanola.

Na *Pseudomonas aeruginosa* je prav tako imel največji vpliv ekstrakt pri srednji koncentraciji 6 g tuje na 100 ml 70% etanola. Pri tej bakteriji (za razliko do ostalih) ni imel nefiltriran koncentrat nobenega učinka.

Grafikon 2: Primerjava inhibicijske cone različnih koncentracij etanolnega ekstrakta tuje pri drugi ponovitvi (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*) (mm)



## 4 RAZPRAVA

S to raziskavo sem pridobila veliko še prej neznanih podatkov in potrdila svojo hipotezo o antimikrobnih lastnostih etanolnega ekstrakta tuje.

Če tako povzamemo rezultate lahko potrdimo prej postavljeno hipotezo, da ima tuja antimikrobne učinke. Ker inhibicijske cone še niso standardizirane, ne moremo primerjati učinkov na organizme med sabo, lahko pa trdimo, da smo videli vsaj minimalni odziv na vseh izbranih patogenih mikroorganizmih (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*). Ugotovili smo tudi, da koncentracija antimikrobnih snovi v etanolnem ekstraktu ni premo sorazmerno povezana z učinkovanjem ekstrakta.

Najbolj presenetljiv rezultat je občutljivost glive *Candida albicans*, ke je rezistentne na številne antimikotike. Ta ugotovitev ima pomembne implikacije za nadaljnje raziskave na tem področju in pri zdravljenju okužb s to glivo (kandidoza). Predvsem raziskave za odkritje posameznih snovi, ki v etanolnem ekstraktu povzročajo učinke. Nadaljnje preiskovanje lahko tako poteka v za to specializiranih laboratorijih.

Z glivo *Candida albicans* tudi dokazujemo, da tuja nima le antibiotičnih lastnosti, ampak tudi antimikotične. Prav tako je pomembna ugotovitev tudi to, da ima tuja te lastnosti le v etanolnem ekstraktu kar potrjuje, da ima ključno vlogo v njegovem učinkovanju prav tujon (ki ni topen v vodi, ampak v 70 % etanolu).

Pri bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* smo v drugem eksperimentu dobili najširšo inhibicijsko cono.

Za prihodnost je torej pomembno, da se raziskovanje na tem področju nadaljuje in da najprej koncentriramo snovi (uparimo etanolni ekstrakt) in nato izvedemo ponovni test. Naslednji korak pa je kolonska kromatografija katere sestavine so tiste, ki imajo antibiotične in antimikotične lastnosti. Lahko bi primerjali tudi etanolne ekstrakte suhih in svežih iglic.

Z ustreznimi kemijskimi metodami bi lahko ugotovili kemijsko zgradbo teh zanimivih biološko aktivnih snovi in tako pripomogli k napredku na tem področju.

## 5 VIRI IN LITERATURA

ABC HOMEOPATHY. *Thuja Occidentalis*. 2009. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://abchomeopathy.com/r.php/Thuj> >

ANNIE'S REMEDY. *Thuja Thuja occidentalis*. 2014. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: < [http://www.anniesremedy.com/herb\\_detail374.php](http://www.anniesremedy.com/herb_detail374.php) >

BELLIS, Mary. *History of antibiotics*. 2014. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: <[http://inventors.about.com/od/pstartinventions/a/Penicillin\\_2.htm](http://inventors.about.com/od/pstartinventions/a/Penicillin_2.htm) >

BRATKOVIČ, Tomaž. *Antibiotiki: čudežna zdravila, ki izgubljajo moč*. 2013. Delavnica. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.

BROCK. *Biology of microorganisms*. 2013. USA: Pearson. Global edition.

EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY. *Guidelines on urological infections*. 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION ROCKVILLE. *Antimicrobial Drug Resistance in Escherichia coli from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002*. 2002. Raziskava. Maryland: Food and Drug Administration, Rockville.

FOSS, Scott. *Candida albicans*. 2013. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: <[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida\\_albicans](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida_albicans) >

FRASER, Susan. *Enterococcus*. 2012. Medscape. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: < <http://emedicine.medscape.com/article/216993-overview> >

INŠTIUT ZA VAROVANJE ZDRAVJA RS. *E. coli v živilih*. 2012. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: < [http://www.zzv-kp.si/wp-content/uploads/e\\_coli\\_200220132.pdf](http://www.zzv-kp.si/wp-content/uploads/e_coli_200220132.pdf) >

INŠTIUT ZA VAROVANJE ZDRAVJA RS. *Staphylococcus aureus v živilih*. 2012. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: <[http://www.ivz.si/Mp.aspx/?ni=23&pi=5&\\_5\\_Filename=attName.png&\\_5\\_MediaId=6419&\\_5\\_AutoResize=false&pl=23-5.3](http://www.ivz.si/Mp.aspx/?ni=23&pi=5&_5_Filename=attName.png&_5_MediaId=6419&_5_AutoResize=false&pl=23-5.3) >

J. ZITTLAU, N. KRIEGISCH, D. HEINKE. *Domača lekarna*. 1999. Ljubljana: Prešernova založba.

NAŠ DOM. *Rastline v vrtu*. Posebna številka revije. 1992. *Thuja occidentalis*. Str. 24

WEBMED. *Find a Vitamin or Supplement: Thuja*. 2009. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: < <http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-1117-thuja.aspx?activeIngredientId=1117&activeIngredientName=thuja&source=1> >

WHITE T. , HOLLEMAN S., ... *Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of Candida albicans*. 2002. Raziskava. American society for microbiology: Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

WHITE, NJ. *Melioidosis*. 2003. Publikacija. The Lancet.

WIKIPEDIA. *Terpene*. 2014. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Terpene>>

WIKIPEDIA. *Thujone*. 2014. [online]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Thujone>>