MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2011, 63: 327 - 331

Budzyńska Aleksandra[1], *Sadowska Beata*[2], *Paszkiewicz Małgorzata*[2], *Różalska Barbara*[2]

Ocena bójczego działania fazy płynnej i frakcji lotnej olejków eterycznych na hodowle biofilmowe *Staphylococcus aureus* oraz *Candida albicans*. Własne rozwiązania metodyczne.

[1]Laboratorium Usług Mikrobiologiczno-Technicznych, [2]Zakład Biologii Zakażeń,
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, UŁ
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. *B. Różalska*
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. *M. Mikołajczyk-Chmiela*

Przedstawiono własną metodykę oceny efektu działania roślinnych olejków eterycznych na biofilm bakterii i grzybów. Parametry metodyczne dostosowano do charakteru fizyko-chemicznego olejków, a procedurę uproszczono tak, aby ryzyko uszkodzenia biofilmu podczas badania było najmniejsze.

Z uwagi na znaną wysoką lekooporność biofilmów wypracowanie standardów alternatywnego leczenia zakażeń przebiegających z ich udziałem stanowi ważny nurt badawczy nowoczesnej mikrobiologii i medycyny. W tym zakresie tematycznym wzrasta zainteresowanie badaniem bezpośredniej aktywności różnych czynników biobójczych pochodzenia naturalnego lub ich połączeń z antybiotykami (2, 5, 6, 7, 10). W celu oszacowania efektu ich działania na biomasę drobnoustrojów stosuje się techniki różniące się sposobem hodowli i analizy biofilmów. W badaniach skryningowych, w odniesieniu do biofilmów tworzonych w warunkach statycznych, najczęściej stosuje się hodowlę drobnoustrojów w 96-studzienkowych płytkach polistyrenowych. Znanych jest wiele procedur analizy wpływu badanych produktów na tak uzyskane biofilmy. Obejmują one np. mikroskopową ocenę przestrzennej struktury biofilmu (mikroskop skaningowy, konfokalny, itp.), ilościowe fluorescencyjne barwienie polimeru pozakomórkowego lub barwienie komórek odróżniające komórki żywe od martwych. W tym samym celu stosuje się testy oceniające metaboliczną aktywność żywych komórek, której miernikiem może być np. stopień redukcji pochodnych tetrazoliowych przez enzymy mitochondrialne drobnoustrojów (9). Dobór procedury oceny żywotności biofilmu zależy w dużym stopniu od planowanego celu pracy i chociaż znanych jest wiele różnych metod, wciąż zachodzi potrzeba opracowania nowych lub modyfikacji znanych testów. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie metodyki własnej służącej ocenie aktywności przeciwbiofilmowej olejku eterycznego.

MATERIAŁ I METODY

Podłoża, odczynniki chemiczne i inne materiały. Podłoże tryptozowo-sojowe (TSB), podłoże Sabouraud'a (BTL, Polska), podłoże RPMI-1640 (CytoGen); goździkowy

olejek eteryczny (*Oleum Caryophylli*) (Pollena Aroma); emulgatory olejku: 1% Tween 20 (Sigma) w H_2O dest. i 96% alkohol etylowy (POCH); MTT - bromek 3[4,5-dimetylo-2--ilo]-2,5-difenylotetrazolu (Sigma). Płytki hodowlane 24-studzienkowe (Becton Dickinson); płytki hodowlane 96-studzienkowe (Nunc); membranowe inserty (0,4 μm) do płytek hodowlanych (Greiner Bio-one).

Badane drobnoustroje. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 oraz *Candida albicans* ATCC 10231. Bakterie hodowano przez 24 godz. w temp. 37°C w bulionie TSB z dodatkiem 0,25% glukozy (TSBGlu), a drożdżaki w płynnym podłożu Sabouraud'a (24 godz., 37°C). Przygotowano zawiesinę komórek *S. aureus* w TSBGlu ($5x10^7$/ml) i blastospor *C. albicans* w podłożu RPMI-1640 ($5x10^5$/ml).

Wyznaczenie stężenia olejku goździkowego hamującego wzrost hodowli planktonowej *S. aureus* i *C. albicans* (MIC). Zastosowano metodę mikrorozcieńczeń w bulionie zgodnie z wytycznymi CLSI, w modyfikacji własnej (3). Po hodowli *S. aureus* i *C. albicans* w obecności olejku (24-48 godz., 37°C), dokonywano spektrofotometrycznej oceny stopnia intensywności ich wzrostu (A_{600}, wielofunkcyjny czytnik płytek Victor2, Finlandia). Jako wartość MIC przyjmowano stężenie olejku powodujące całkowite zahamowanie wzrostu ($A_{600} = A_{600}$ kontroli negatywnej). Wszystkie próby wykonywano w trzech powtórzeniach.

Ocena wrażliwości biofilmu *S. aureus* i *C. albicans* na olejki eteryczne w fazie płynnej i lotnej. Na insertach umieszczonych w 24-studzienkowej płytce hodowlanej zakładano biofilmy *S. aureus* i *C. albicans*. W tym celu studzienki płytki wypełniano 1 ml podłoża hodowlanego a na powierzchnię membran insertów nanoszono po 300 μl zawiesiny bakterii bądź grzybów. Po inkubacji (24 godz., 37°C) delikatnie usuwano znad biofilmów zawiesinę komórek wolnych, inserty przenoszono do nowych studzienek płytki i jednokrotnie płukano PBS. Następnie biofilmy poddawano bezpośredniemu działaniu olejku goździkowego przez zanurzenie insertu w 1 ml roztworu olejku o stężeniu równym MIC (wyznaczonym wcześniej metodą mikrorozcieńczeń w bulionie) lub wielokrotności MIC (x2, x4, x8, x16). Drugą serię insertów z utworzonymi biofilmami poddawano działaniu frakcji lotnej - inserty umieszczano pojedynczo w indywidualnych, szczelnie zamykanych pojemnikach zawierających 0,5 ml roztworu olejku, pozostawiając 3 mm odległości membrany od powierzchni płynu. Po 4-ro godzinnej inkubacji inserty przenoszono do studzienek płytek hodowlanych i barwiono MTT. Stopień redukcji MTT mierzono ilością powstałego formazanu, po jego solubilizacji i odczycie spektrofotometrycznym przy długości fali A_{550} (4). Wyznaczano stężenie olejku powodujące co najmniej 75% redukcję aktywności metabolicznej drobnoustrojów (minimal biofilm eradication concentration, $MBEC_{75}$). W układzie kontrolnym oceniano aktywność/żywotność bakterii lub grzybów w biofilmach utworzonych w warunkach jak opisano, poddanych działaniu jedynie emulgatora olejku.

W celach porównawczych wykonano klasyczny 24-godzinny test eradykacji biofilmu *S. aureus* i *C. albicans*, utworzonego w 96-studzienkowych mikropłytkach polistyrenowych. Ocenę efektu działania olejku goździkowego (fazy płynnej) przeprowadzono stosując test redukcji MTT w sposób opisany wcześniej i wyznaczono $MBEC_{75}$. Badania zasadnicze i kontrolne wykonano trzykrotnie.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania nad możliwością zastosowania do walki z bakteryjnymi i grzybowymi patogenami człowieka grupy różnych klas chemicznych fitozwiązków są prowadzone w wielu ośrodkach naukowych w Polsce i na świecie (8, 11, 12, 15, 16). Rosnące zainteresowanie tym nurtem badawczym wynika z coraz większych ograniczeń skuteczności chemioterapii zakażeń drobnoustrojami o wysokim stopniu lekooporności. Nowatorskim podejściem jest np. badanie wykorzystania roślinnych olejków eterycznych jako produktów alternatywnych lub pomocniczych w terapii zakażeń biofilmowych (5, 6, 7, 10).

W prezentowanej pracy stwierdzono, że olejek goździkowy oraz jego lotne składniki wykazują aktywność przeciwbiofilmową, ocenianą w oryginalnie opracowanym teście „ínsertowym". W kolejno wykonanych doświadczeniach uzyskano wysoką powtarzalność wyników, tym samym uznano przedstawioną metodykę za przydatną w dalszych planowanych badaniach z tego zakresu. Ustalone $MBEC_{75}$ fazy płynnej olejku wobec biofilmu *S. aureus* ATCC 6538 i *C. albicans* ATCC 10231 wynosiło 3,125% (v/v). Było to stężenie wyższe, odpowiednio, 8 lub 16x od stężenia hamującego wzrost hodowli planktonowych w czasie 24-ro godzinnej ko-inkubacji; wynoszące odpowiednio 0,19% (*S. aureus*) i 0,39% (*C. albicans*). Należy jednak zauważyć, iż ten istotny efekt redukcji żywotności biofilmu obu patogenów uzyskano w tej pracy już po ich 4-ro godzinnej ekspozycji na działanie olejku goździkowego. $MBEC_{75}$, wyznaczone jako kryterium skuteczności, zostało w obu przypadkach przekroczone - stopień redukcji aktywności enzymów mitochondrialnych spowodowany przez działanie olejku wynosił 82-88%. Uzyskanie takiego rezultatu świadczy o wysokiej aktywności olejku goździkowego, co potwierdzono w równolegle przeprowadzonym teście, w którym biofilmy *S. aureus* i *C. albicans* utworzone w 96-studzienkowych płytkach hodowlanych poddano działaniu fazy płynnej olejku goździkowego przez 24 godziny. W tym przypadku $MBEC_{75}$ było istotnie niższe i wynosiło 0,39% a więc było tylko dwukrotnie wyższe od MIC wyznaczonego dla hodowli planktonowej *S. aureus* i równe MIC dla hodowli *C. albicans*.

Stężenie frakcji lotnej olejku goździkowego aktywne wobec biofilmu *S. aureus* i *C. albicans* w czasie 4 godzin działania przeliczano na objętość mikroatmosfery pojemnika, w którym umieszczano insert z eksponowanym biofilmem. Stwierdzono, że $MBEC_{75}$ frakcji lotnej wobec biofilmu *S. aureus* wynosiło 0,66% a wobec biofilmu *C. albicans* – 1,32% (Tabela I).

Tabela I. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejku goździkowego (faza płynna i frakcja lotna).

Drobnoustrój	MIC (%, v/v)	$MBEC_{75}$ (%, v/v)		
	24 godz.[1]	24 godz.[2]	4 godz.[3]	4 godz.[4]
S. aureus ATCC 6538	0,19	0,39	3,12	0,66
C. albicans ATCC 10231	0,39	0,39	3,12	1,32

[1] - minimalne stężenie fazy płynnej olejku hamujące wzrost hodowli planktonowej, test mikrorozcieńczeń w bulionie (inkubacja 24 godz.)

[2] - minimalne stężenie fazy płynnej olejku eradykujące biofilm w 96-studzienkowych mikropłytkach, test redukcji MTT (inkubacja 24 godz.)

[3] - minimalne stężenie fazy płynnej olejku eradykujące biofilm na insertach hodowlanych, test redukcji MTT (inkubacja 4 godz.)

[4] - minimalne stężenie frakcji lotnej olejku eradykujące biofilm na insertach hodowlanych, test redukcji MTT (inkubacja 4 godz.)

Uzyskanie w niniejszej pracy efektu działania frakcji lotnej olejku jest interesujące w świetle faktu planowanych przez nas badań nad zwalczaniem w ten sposób biofilmów bakteryjnych, grzybowych i biofilmów mieszanych, będących przyczyną np. przewlekłych zakażeń miejscowych. Propozycja zastosowania frakcji lotnej olejku wydaje się być uzasadniona obserwacjami klinicznymi, z których wynika, że miejscowa aplikacja chemioterapeutyków w kremie, maści lub zasypce bezpośrednio na zakażoną ranę może utrudniać odpływ wydzieliny, zwiększać proces zapalny i opóźniać ziarninowanie tkanki (1, 13, 17, 18, 19). W tym kontekście, z uwagi na możliwe działanie drażniące lub cytotoksyczne olejków, skuteczność ich frakcji lotnych wykazana w tej pracy wobec *S. aureus* i *C. albicans* może okazać się dobrą opcją terapeutyczną. To, że składniki lotne olejku goździkowego okazały się bardziej efektywne niż olejek w fazie płynnej wytłumaczyć można ich lepszą penetracją w głąb biomasy, zaś różnice wartości $MBEC_{75}$ dla *S. aureus* i *C. albicans* wynikać mogą z różnej struktury ich biofilmu. Niemniej, wobec znanej wysokiej oporności populacji biofilmowej na antybiotyki, antyseptyki i preparaty dezynfekcyjne, uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, iż aktywność przeciwbiofilmowa olejku goździkowego jest znacząca.

Zaproponowany model oceny *in vitro* efektywności przeciwbiofilmowej olejków, z zastosowaniem membranowych insertów do płytek hodowlanych, zapewnia minimalne naruszenie jego integralności podczas badania. Co ważne, pozwala też na łatwe zbadanie aktywności frakcji lotnej tych preparatów i umożliwi w przyszłości wyznaczenie indeksu biozgodności (BI, biocompatibility indeks), tj. zależności między działaniem przeciwdrobnoustrojowym olejków a efektem cytotoksycznym wobec komórek eukariotycznych (14). Ponadto, przedstawiony test będzie przydatny w ustalaniu kinetyki działania dowolnych produktów oraz np. w przeprowadzaniu analizy jakościowej i ilościowej produktów metabolizmu populacji biofilmowej, uwalnianych do podłoża wzrostu. Tak więc proponowany test spełnia warunek uzasadnionej merytorycznie nowości metodycznej.

A. Budzyńska, B. Sadowska, M. Paszkiewicz, B. Różalska

Assessment of essential oils activity used in liquid or volatile phase against biofilm cultures of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The methodological study.

SUMMARY

Biofilm formation is a significant factor in chronic infections with fungal and bacterial pathogens. Due to the high drug resistance of biofilm populations and the frequent failures of chemotherapy in such infections, it seems necessary to take recourse to unconventional treatment methods involving e.g. the use of some phytocompounds such as essential oils or their components. In order to evaluate the effect of their action on the microbial biomass a variety of techniques are used. However, there is still a need to develop new tests or modifications of these known, for the biofilm viability assessment. They should be adapted to the physico-chemical nature of the tested compounds and should decrease the risk of biofilm damage during staining procedure. We described a test assessing the effect of essential oils on bacterial and fungal biofilm formed on the membrane of cell culture inserts. The proposed model provides a minimal violation of the biofilm integrity during the test. It allows easily explore the activity of essential oil volatile fraction and is useful in determination of the kinetics of their action. Using this test it is also easy to examine the relationship between antimicrobial activity

and the cytotoxic effect, known as the biocompatibility index (BI, biocompatibility index). Moreover, it allows qualitative and quantitative analysis of metabolic products, released into the growth medium from biofilm's cells. In successively repeated experiments high reproducibility of results has been obtained, thus the developed methodology seems to be useful in our future studies in this field.

PIŚMIENNICTWO

1. *Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM.* Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. J. Pharm. Sci. 2008; 97: 2892-923.
2. *Bryers JD.* Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng*. 2008; 100: 1-17.
3. *Budzyńska A, Więckowska-Szakiel M, Kalemba D i inni.* Weryfikacja parametrów metodycznych oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej olejków eterycznych. Med Dośw Mikrobiol. 2009; 61: 281-7.
4. *Budzyńska A, Więckowska-Szakiel M, Sadowska B i inni.* Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. Pol J Microbiol. 2011; 60: 35-41.
5. *Chao S, Young G, Oberg C, Nakaoka K.* Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococus aureus* (MRSA) by essential oils. Flavour and Fragrance J. 2008; 23: 444-9.
6. *Denning DW, Hope WW.* Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. Trends Microbiol. 2010; 18: 195-204.
7. *Douglas LJ. Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003; 11: 30-6.
8. *Hammer KA, Carson CF, Riley TV*. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract. J Appl Microbiol. 1999; 86: 985-90.
9. *Hanning C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A.* Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. J. Med. Microbiol. 2010; 59: 1-7.
10. *Harriott M, Noverr MC. Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53: 3914-22.
11. *Inouye S, Abe S, Yamaguchi H, Asakura M.* Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. Int J Aromather 2003; 1: 33-41.
12. *Kędzia A*. Ocena działania przeciwbakteryjnego olejku goździkowego (*Oleum Caryophylli*). Postępy Fitoterapii 2007; 2: 66-70.
13. *Morales DK, Hogan DA. Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. PLoS Pathog. 2010; 6: e1000886
14. *Muller G, Kramer A.* Biocompatibility index of antiseptic agent by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J. Antimicrob. Chemother. 2008; 61: 1281-7.
15. *Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L.* Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. J Med Microbiol 2009; 58: 1454-62.
16. *Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R.* Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - an overview. Forsch Komplementmed. 2009; 16: 79-90.
17. *ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T i inni.* Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J. Dent. Res. 2009; 88: 105-15.
18. *Tullio V, Nostro A, Mandras N* i inni. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. J Appl Microbiol 2007; 102: 1544-50.
19. *Warnke PH, Sherry E, Russo PAJ i inni.* Antibacterial essential oils in malodorous cancer patients: Clinical observations in 30 patients. Phytomedicine 2006; 13: 463-7.

Otrzymano: 7 IX 2011r.

Adres Autora: 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii UŁ, E-mail: rozab@biol.uni.lodz.pl