

Antimikrobna aktivnost etarskog ulja korena *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* na kliničke izolate bakterija

**Sofija Dorđević¹, Marina Milenković², Silvana Petrović³,
Jelena Antić Stanković², Slavica Žižić⁴**

¹Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić",
Tadeuša Košćuška 1, 11000 Beograd

²Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Farmaceutski fakultet,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

³Institut za farmakognoziju, Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450,
11221 Beograd

⁴Institut za zaštitu zdravlja Srbije "Dr Milan Jovanović Batut",
Dr Subotića 5, 11000 Beograd

Kratak sadržaj

Intrahospitalne infekcije predstavljaju veliki kliničko-terapijski problem, jer su izazvane sojevima bakterija koji pokazuju izrazitu rezistenciju na veći broj antibiotika sa različitim mehanizmima delovanja (multirezistentni sojevi).

U cilju iznalaženja potencijalno novih prirodnih sirovina sa antimikrobnim dejstvom, u radu je ispitivano antibakterijsko delovanje etarskog ulja izolovanog iz korena vilinog sita, *Carlina acaulis* subsp. *caulescens*, na kliničke izolate bakterija koje poslednjih godina često dovode do intrahospitalnih infekcija. Ispitivanje antibakterijskog delovanja 4% rastvora etarskog ulja u apsolutnom etanolu izvršeno je agar-difuzionom i bujon-dilucionom metodom na različite sojeve bakterija: *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Acinetobacter spp.*, koji su izolovani iz briseva rana i urina hospitalizovanih bolesnika. Ispitivani rastvor etarskog ulja ispoljio je visoku antibakterijsku aktivnost prema *Streptococcus pyogenes*, znatnu na *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, a umerenu na *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*.

Ključne reči: *Carlina acaulis* subsp. *caulescens*, koren, etarsko ulje, antimikrobna aktivnost, klinički izolati bakterija.

Uvod

Intrahospitalne (nozokomijalne) infekcije javljaju se kod 10% bolesnika i najčešće su lokalizovane na koži, u urinarnom i respiratornom traktu. Većina izolovanih sojeva bakterija koji izazivaju navedene infekcije, pokazuje izrazitu rezistenciju na veći broj antibiotika. Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike su kompleksni, različiti i još uvek nedovoljno razjašnjeni.

Osnovni razlozi razvoja bakterijske rezistencije, posebno bolničkih sojeva, su nepravilna upotreba antibiotika, slabo organizovana infrastruktura zdravstvene zaštite i propusti u postupcima koji su neophodni za kontrolu infekcija u jednoj ustanovi.

Infekcije rana i kože najčešće izazivaju: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* i *Proteus spp.* Piogene infekcije kože i potkožnog tkiva (impetigo, folikulitis, furunkuli, karbunkuli i celulitis) pretežno izazivaju stafilokoke i streptokoke, a osnovna karakteristika navedenih infekcija je pojava supuracije, nekroza tkiva i formiranje abscesa.

Nozokomijalne urinarne infekcije često uzrokuju: *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus spp.*

Poslednjih godina kao uzročnici bolničkih infekcija sve češće se izoluju bakterije koje predstavljaju normalnu mikrofloru kože, kao što su koagulaza negativne stafilokoke i *Acinetobacter spp.* (1, 2, 3).

U cilju iznalaženja potencijalno novih prirodnih sirovina sa antimikrobnim dejstvom, u ovom radu ispitivano je antibakterijsko delovanje etarskog ulja izolovanog iz korena vilinog sita, *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* (Asteraceae) na kliničke izolate bakterija, koje poslednjih godina predstavljaju najveći rizik za nastanak intrahospitalnih infekcija.

Eksperimentalni deo

1. Materijal

1.1. Biljni materijal

Koren vilinog sita, *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* prikupljen je sa kamenitih i osunčanih padina planine Durmitor (Žabljak) avgusta 2003. godine, očišćen i osušen na sobnoj temperaturi.

1.2. Sojevi bakterija

Ispitana je *in vitro* osetljivost sojeva bakterija *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* i *Pseudomonas aeruginosa*

izolovanih iz briseva rana i kože, i sojeva *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* izolovanih iz urinokultura hospitalizovanih pacijenata lečenih u Kliničkom centru Srbije (Tabela I).

2. Metode

2.1. Izolacija etarskog ulja

Izolacija etarskog ulja iz osušenog, samlevenog korena *C. acaulis* subsp. *caulescens* sprovedena je destilacijom pomoću vodene pare u aparatu po Klevendžeru po propisu Ph. Jug. IV, postupkom III (4). Nakon izvršene destilacije, petroletarski rastvor etarskog ulja i etar upotrebljen za ispiranje aparature su sjedinjeni, smeša osušena preko bezvodnog natrijum-sulfata i organski rastvarači uklonjeni otparavanjem.

2.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

2.2.1. Agar-difuzioni metod

Difuzioni metod je izveden na Mueller-Hinton i krvnom agaru (Torlak, Beograd), debljine 4 mm, a korišćena je osamnaestočasovna bujonska kultura bakterija. Navedene podloge su zasejane inokulumom gustine 10^6 bakterija/cm³ da bi se postigao semikonfluentan rast. Na zasejanu podlogu nanošeno je po 20 μ l 4% rastvora etarskog ulja u apsolutnom etanolu, a kao kontrola korišćen je apsolutni etanol. Nakon inkubacije koja je trajala 18 h u termostatu na 37 °C pod aerobnim uslovima, izvršeno je merenje prečnika zona inhibicije u milimetrima. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti četiri izmerene zone inhibicije za svaki pojedinačni soj (5).

2.2.2. Mikrodilucioni metod

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) etarskog ulja određena je primenom bujon mikrodilucionog metoda u pločama za mikrotitraciju sa 96 mesta. Korišćena je osamnaestočasovna kultura navedenih bakterijskih sojeva (gustine 5×10^5 cfu/ml) u Mueller-Hinton bujonu sa dodatkom Tween 80 (finalna koncentracija 0.5% v/v). Za ispitivanje je korišćen rastvor etarskog ulja u apsolutnom etanolu, u opsegu koncentracija od 1.25 do 40 μ l/ml (v/v). U testu su postavljene i pozitivna kontrola bakterijskog rasta, kao i kontrola sterilnosti etarskog ulja. Ploče su inkubirane u aerobnoj atmosferi, na 37 °C u toku 24 h, a nakon toga je semikvantitativno očitavan porast bakterija na osnovu zamućenja tečne podloge i formiranja taloga na dnu bazenčića (5).

Rezultati

Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti (agar-difuzionom i mikrodilucionom metodom) etarskog ulja izolovanog iz korena vilinog sita, *C. acaulis* subsp. *caulescens* na kliničke izolate iz rana i urina prikazani su u Tabeli I.

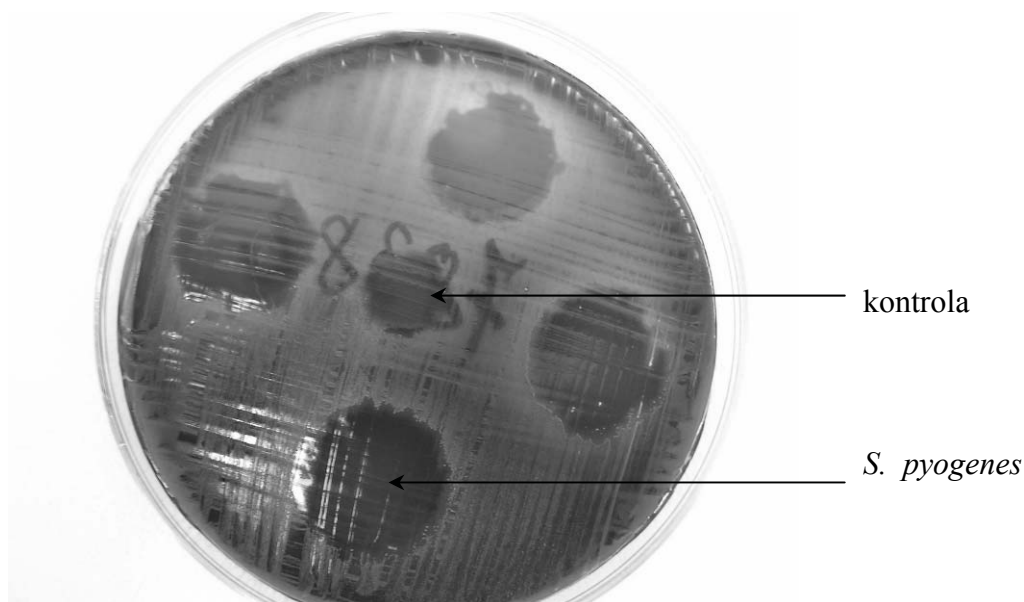
Rezultati difuzionog metoda interpretirani su na osnovu prethodno ustanovljenih kriterijuma: **Gram (+) bakterije** >18 mm (osetljiv), 14-18 mm (intermedijerno osetljiv), <14 mm (rezistentan); **Gram (-) bakterije** >16 mm (osetljiv), 13-16 mm (intermedijerno osetljiv), <13 mm (rezistentan) (6).

Tabela I Antibakterijska aktivnost etarskog ulja korena *C. acaulis* subsp. *caulescens* na kliničke izolate bakterija

Table I Antibacterial activity of essential oil from root of *C. acaulis* subsp. *caulescens* on clinical isolates of bacteria

| <i>Testirane bakterije</i> | Osetljivi broj izolata (zona inhibicije) | Intermedijerni broj izolata (zona inhibicije) | Rezistentni broj izolata (zona inhibicije) | MIC $\mu\text{m/ml}$ |
|-------------------------------|--|---|--|----------------------|
| Gram + | | | | |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 17 (24 mm)* | 0 | 0 | 0.25 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 (22 mm) | 3 (16 mm)* | 2 (10 mm)* | 0.25 |
| Gram - | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 4 (18 mm)* | 0 | 5 (10 mm)* | 8 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2 (22 mm)* | 0 | 5 (12 mm)* | 8 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 3 (20 mm)* | 0 | 1 (8 mm) | n.t. |
| <i>Acinetobacter spp.</i> | 2 (18 mm)* | 4 (13 mm)* | 0 | 0.25 |

*- srednja vrednost



Slika 1 Zone inhibicije rasta *Streptococcus pyogenes*-a na krvnom agaru
Figure 1 Zones of inhibition of growth *Streptococcus pyogenes* on blood agar

Diskusija

Imajući u vidu probleme koji su vezani za terapiju intrahospitalnih infekcija, sve veći broj istraživanja u svetu usmeren je ka iznalaženju novih prirodnih sirovina, uglavnom etarskih ulja, sa antimikrobnom aktivnošću. Pored ispitivanja antimikrobne aktivnosti na standardne sojeve, intezivno se vrše istraživanja sa sojevima bakterija i gljivica izolovanih iz kliničkih uzoraka.

Za efikasno lečenje akutnog otitis media prouzrokovanog pneumokokama ili *Haemophilus influenzae*, može da se koristi etarsko ulje bosiljka *Ocimum basilicum* (7). Etarska ulja vrsta *Artemisia scoparia* i *A. capillaries* ispoljila su antibakterijsku aktivnost na 15 različitih vrsta bakterija, uzročnika infekcija usne duplje (8). Visok antimikrobni efekat na multirezistentne patogene iz kliničkih izolata, naročito na *E. coli*, *Candida albicans* i metacilin rezistentni *S. aureus*, pokazala su etarska ulja *Satureja* vrsta (*S. montana* i *S. cuneifolia*) (9). Rota i saradnici ustanovili su da etarska ulja timijana (*Thymus vulgaris*), *Salvia* vrsta (*S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. lavandulifolia*), *Lavandula* vrsta (*L. latifolia*, *L. angustifolia* i tri hibrida), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), izopa (*Hyssopus officinalis*) i čubura (*Satureja montana*), u malim koncentracijama deluju na alimentarne patogene u konzerviranim namirnicama,

pa bi ona mogla da budu alternativna zamena konvencionalnim aditivima (konzervansima) (10).

Tradicionalno, koren vilinog sita, *Carlinae radix*, upotrebljava se za lečenje različitih infekcija kože, za zarašćivanje rana i čireva i ispiranje usne duplje (11). Prethodnim ispitivanjima utvrđeno je da koren *C. acaulis* subsp. *caulescens* sadrži 1.4% etarskog ulja, sa benzil 2-furilacetenom (karlina-oksidom) kao glavnom komponentom (preko 90%) (12). Ranijim istraživanjima ustanovljeno je da ovo etarsko ulje ispoljava antimikrobnu aktivnost koja je ispitana sa standardnim sojevima (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella paratyphi B*, *Shigella flexneri*, *Aspergillus niger* i *C. albicans*) (13).

Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da 4% etanolni rastvor etarskog ulja korena vilinog sita, *C. acaulis* subsp. *caulescens*, ispoljava visoku antibakterijsku aktivnost na svih 17 ispitivanih sojeva *S. pyogenes*, znatnu na *Acinetobacter spp.*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*, a umerenu na *E. coli* i *K. pneumoniae* (Tabela I, Slika 1).

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja antibakterijske aktivnosti na kliničke izolate iz briseva rana i urinokultura, i prethodnih ispitivanja sa standardnim sojevima bakterija i gljivica, može se zaključiti da etarsko ulje korena vilinog sita, *C. acaulis* subsp. *caulescens* ispoljava značajnu antimikrobnu aktivnost i da bi se moglo koristiti za izradu fitopreparata za spoljašnju primenu kod odgovarajućih bakterijskih i gljivičnih infekcija.

Zahvalnica

Sredstva za izradu ovog rada obezbeđena su delom od strane Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Srbije u okviru projekta pod evidencionim brojem ugovora 1568.

Literatura

1. Greenwood D, Slack R, Peutherer J. Medical microbiology. 16th ed. New York: Elsevier Science, 2002: 662.
2. Brooks G, Butel J, Morse S. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical microbiology. 23th ed. London: The McGraw-Hill Companies 2004: 223.
3. Spicer JW. Clinical Bacteriology, Mycology and Parasitology. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000: 190.
4. Farmakopeja SFRJ, Pharmacopoea Jugoslavica, editio quarta (Ph. Jug. IV), vol. 2, Beograd: Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, 1984: 126-28.
5. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, Akpulat HA. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). J Ethnopharmacol 2003; 87: 215-20.
6. Omer MEA, Elnima EI. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. Fitoterapia 2003; 74: 122-26.
7. Kristinsson KG, Magnúsdóttir AB, Petersen H, Hermansson A. Effective treatment of experimental acute otitis media by application of volatile fluids into the ear canal. J Infect Dis 2005; 191: 1876-80.
8. Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Moon SE, Kim JY, Kil BS, Song YH. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris*. Planta Med 2005; 71: 186-90.
9. Skočibušić M, Bezić N. Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. Phytother Res 2005; 18: 967-70.
10. Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. J Food Prot 2004; 67: 1252-256.
11. Wichtl M. Teedrogen und Phytopharmaka. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2002: 114-115.
12. Chalchat JC, Đorđević S, Gorunović M. Composition of the essential oil from the root of *Carlina acaulis* L. Asteraceae. J Essent Oil Res 1996; 8: 577-78.
13. Đorđević S, Lukić S, Mraović M, Žižić S. Antimicrobial activity of essential oil of *Carlina acaulis* L., Asteraceae. Pharm Pharmacol Lett 1998; 4: 126-28.

Antimicrobial activity of essential oil from root of *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* on clinical isolates of bacteria

**Sofija Đorđević¹, Marina Milenković², Silvana Petrović³,
Jelena Antić Stanković², Slavica Žižić⁴**

¹Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić",
Tadeuša Koščuška 1, 11000 Belgrade

²Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia and Montenegro

³Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia and Montenegro

⁴Institute for Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanović Batut",
Dr Subotića 5, 11000 Belgrade, Serbia and Montenegro

Summary

Intrahospital infections are great clinico-therapeutical problem because they are caused by strains of bacteria which are multiresistant. For the purpose of finding new natural raw materials with antimicrobial activity, in this study we tested antibacterial activity of essential oil from *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* root on clinical isolates of bacteria which are the most common etiological agents of intrahospital infections. Investigation of antibacterial activity of 4% essential oil solution in absolute ethanol was performed by agar dilution technique and broth microdilution technique on different strains of bacteria: *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter spp.*, isolated from wound swabs and urine of hospitalised patients. Tested solution of essential oil showed high antibacterial activity against *Streptococcus pyogenes*, medium against *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and moderate against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

Key words: *Carlina acaulis* subsp. *caulescens*, root, essential oil, antimicrobial activity, clinical isolates of bacteria.
