

Raport/Studiu

Utilizarea modelului *in vitro* pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonator: Prof. dr. Gabriela Tănăsie, Prof. dr. Carmen Panaitescu

Membri: Doctorand Cristina Gaspar, Doctorand Alina - Georgiana Simina,

Biolog Simona Anghel, Asistent Univ. Csilla Zambori

Data finalizării: 15.11.2020

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Oncogen Center* - financed by project "A *bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance*", in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

1. Introducere

Majoritatea plantelor medicinale posedă activitate antimicrobiană datorită prezenței uleiului esențial. Natura, compoziția structurală și grupurile funcționale prezente în uleiurile esențiale joacă un rol important în determinarea activității antimicrobiene. Uleiurile esențiale conțin o varietate de molecule volatile, cum ar fi terpeni și terpenoide, compuși aromatici și alifatici derivați de fenol, care ar putea avea consecințe bactericide, virucide și fungicide. Uleiurile esențiale afectează în mod direct membrana celulară a microorganismului patogen, provocând o creștere a permeabilității și scurgerii constituenților intracelulari vitali și, în cele din urmă, perturbă respirația celulară și sistemul enzimatic microbial. Mai mult, au prezentat, de asemenea, efecte citotoxice asupra celulelor vii datorită tipului și concentrației lor. Prin urmare, s-a sugerat că extractele de uleiuri esențiale din plante medicinale ar putea fi utilizate ca substanțe naturale antimicrobiene alternative și, de asemenea, ar putea juca un rol important în descoperirea de noi medicamente (Akhtar M. et.al., 2014).

Au fost propuse diverse mecanisme ale activității antibacteriene a uleiurilor esențiale. Uleiurile esențiale destabilizează în primul rând arhitectura celulară, ducând la descompunerea integrității membranei și la permeabilitatea crescută, care perturbă multe activități celulare, inclusiv producția de energie, transportul membranar și alte funcții de reglare metabolică. Efectul uleiurilor esențiale asupra membranei celulare poate ajuta la diverse procese vitale, cum ar fi procesele de conversie a energiei, procesarea nutrienților, sinteza macromoleculilor structurale și secreția regulatorilor de creștere. Uleiurile esențiale pot afecta atât învelișul extern al celulei cât și citoplasma. Datorită naturii lor lipofile, uleiurile esențiale sunt ușor de penetrat prin membranele celulare bacteriene. S-a raportat că uleiurile esențiale din diferite plante medicinale cauzează o creștere a permeabilității membranelor celulare bacteriene, ducând la scurgerea componentelor celulare și la pierderea ionilor. Efectul antibacterian al esențelor de uleiuri este legat de potențialele membranelor, de întreruperea pompelor de protoni și de afectarea producerii de ATP. Această modificare a organizării celulare poate provoca efect de cascada, rezultând alte organite celulare afectate. Uleiurile esențiale trec prin peretele celular și membrana citoplasmatică, și pot perturba disponerea acizilor grași, a straturilor fosfo-lipidice și a moleculelor de polizaharide. Toate aceste evenimente pot fi responsabile de coagularea componentelor celulare interne din citoplasma și descompunerea legăturilor dintre straturile proteice. Variabilitatea activității antimicrobiene a esențialului uleiurilor către microorganismul investigat pot fi atribuite aduse diferențelor calitative și cantitative în constituția uleiurilor individuale. S-a observat că compoziția uleiurilor esențiale variază în funcție de condițiile climatice și de mediu locale; în consecință, au bioactivități diferite. Unele uleiuri esențiale și componentele lor sunt foarte activ împotriva bacteriilor deși nu împotriva ciupercilor și invers, în timp ce unele uleiuri esențiale stimulează creșterea unor microorganisme. (Demo M. Et.al., 2005)

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

La investigarea activității antimicrobiene a extractelor uleioase sau a extractelor din alimente, s-a constatat că sunt necesare concentrații mai mari în comparație cu studiile in vitro. Proprietățile matricei alimentare care pot afecta activitatea uleiurilor esențiale și a extractelor includ; pH-ul, cu o activitate mai mare observată la un pH mai scăzut datorită hidrofobicității crescute a uleiurilor, a temperaturii la care sunt stocate alimentele, a cantității de oxigen prezent, precum și a conținutului de apă, proteine și grăsimi. Conținutul ridicat de grăsimi pare să scadă activitatea antimicrobiană, oferind potențial protecție bacteriilor. Mulți au propus utilizarea uleiurilor esențiale și a extractelor de plante ca alternative naturale la substanțele chimice utilizate în mod obișnuit în industria alimentară pentru a preveni sau reduce contaminarea de către agenții patogeni de origine alimentară. Utilizarea uleiurilor esențiale și a extractelor ca antimicrobieni naturali sau conservanți face apel la „consumismul verde” care a apărut în ultimele două decenii, oferind în același timp un mijloc de a proteja publicul de bolile de origine alimentară. În general, mulți compuși vegetali și-au demonstrat eficacitatea împotriva unui număr de agenți patogeni alimentari in vitro și în sistemele alimentare model și, prin urmare, au potențialul de a fi aplicați în alimente pentru a-și îmbunătăți siguranța microbiologică. Cercetări suplimentare vor ajuta în aplicațiile comerciale ale acestor compuși în industria alimentară. (Cordery A. et.al., 2018)

Bolile cauzate de consumul de alimente contaminate de agenți patogeni au o importanță mondială din punct de vedere al sănătății publice. Uleiurile esențiale din plante câștigă interes pentru potențialul lor ca ingrediente conservante sau tratamente decontaminante. Uleiurile esențiale și componentele lor sunt utilizate pe scară largă ca ingrediente aromatice într-o mare varietate de alimente, băuturi și produse de cofetărie, aplicarea lor în controlul agenților patogeni ar putea reduce riscul de focare provocate de alimente și ar asigura consumatorilor produse alimentare sigure. Anumite plante și extracte utilizate ca agenți de aromatizare sunt cunoscute activități antimicrobiene care oferă o alternativă potențială la conservanții sintetici. (Gyorgy E., 2010)

Plantele medicinale și aromatice constituie o mare parte a florei naturale și sunt considerate o resursă importantă în diverse domenii, cum ar fi industria farmaceutică, aromă și fragranță, parfumerie și cosmetică. În prezent, mai mult de 80% din populația globală depinde de medicamentele tradiționale pe bază de plante pentru tratarea diferitelor probleme de sănătate umană. Potrivit unei estimări, valoarea produselor pe bază de plante pe piața globală este de aproximativ 62 miliarde USD, iar previziunile vor crește până la 5 miliarde USD până în 2050. Peste 9000 de plante native au fost identificate și înregistrate pentru proprietățile lor curative și aproximativ 1500 de specii sunt cunoscute pentru aroma și aroma lor. Industriile farmaceutice și mai mult de 250 de tipuri de uleiuri esențiale, cu valoare de 1,2 miliarde USD, sunt comercializate anual pe piața internațională. (Swamy M.K. et.al., 2016)

Utilizarea compușilor antimicrobieni naturali în alimente a câștigat multă atenție de către consumatori și industria alimentară. Acest lucru se datorează în primul rând doi factori majori. În primul rând, utilizarea greșită și manipularea greșită a antibioticelor a dus la creșterea dramatică a unui grup de microorganisme, inclusiv agenți patogeni de origine alimentară, care sunt nu numai rezistente la antibiotice, ci și mai tolerante la mai multe metode de procesare și conservare a alimentelor. În plus, creșterea gradului de conștientizare a consumatorilor cu privire la potențialul impact negativ al conservanților sintetici asupra sănătății față de beneficiile aditivilor naturali a generat interes în rândul cercetătorilor în dezvoltarea și utilizarea produselor naturale în alimente.

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

Uleiurile esențiale sunt compuși volatili, naturali, complecși caracterizați printr-un miros puternic și sunt formate din plante aromatice ca metaboliți secundari. Proprietățile de bioactivitate ale uleiurilor esențiale sunt, în general, determinate de compușii majori prezenți în ele. Au fost utilizate pe scară largă pentru aplicații bactericide, virucide, fungicide, antiparazitare, insecticide, medicinale și antioxidante. Activitatea biologică a uleiurilor poate fi comparată cu activitatea preparatelor farmaceutice produse sintetic. Astfel, uleiurile esențiale sunt extracte naturale promițătoare care necesită o evaluare suplimentară pentru o posibilă aplicare ca supliment, conservanți sau antioxidanți în industria alimentară sau farmaceutică. (Shaaban HA, 2020)

În studiul de față ne-am propus:

- Testarea acțiunii antimicrobiene a unor uleiuri esențiale și extracte vegetale, utilizând pierderea de masă în funcție de densitatea optică – tehnica microdiluțiilor în bulion
- Testarea proprietăților unor extracte vegetale de a împiedica formarea biofilmului bacterian, prin tehnica în plăci de microtitrare
- Testarea acțiunii antimicrobiene a unor extracte vegetale prin metoda disc-difuzimetrică

2. Materiale si metode

Materiale

2.1. Uleiurile esențiale

Cele două uleiuri esențiale (UE) testate, de busuioc (*Ocimum basilicum*) (Fares®) și de cuișoare (*Eugenia caryophyllus*) (©Bionovativ, gama Life) au fost procurate din comerț (Fig. 1). UE de cuișoare este obținut din bobocii floralii proveniți de la specia *Eugenia caryophyllus*, fam. *Myrtaceae*. Principalii compuși volatili conținuți sunt: eugenol 70-90%, cariofilen și acetat de eugenil (<https://fares.ro/produs/cuioare-a7/>; <https://life-bio.ro/produs/ulei-esential-de-busuioc-ultra/>).

Pentru evaluarea activității antimicrobiene, UE au fost testate în volume de 4, 8 și 10 μl.

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni



Figura 1. Uleiurile esențiale

2.2. Extractele vegetale

Soluțiile stoc (E), la concentrația de 20 mg/ml, au fost preparate prin dizolvarea extractelor liofilizate în alcool 80%. S-au folosit cinci extracte:

- busuioc (*Ocimum basilicum*) (E1),
- leurdă (*Allium arsinum*) (E2),
- salcâm (*Robinia pseudocacia*) (E3),
- coada calului (*Equisetum arvense*) (E4)
- pelin (*Artemisia absinthium*) (E5).

2.3. Tulpinile bacteriene utilizate și prepararea inoculului (I)

Pentru testarea activității antimicrobiene a UE și E, prin tehnica microdiluțiilor în bulion și pentru evaluarea capacității E de a împiedica formarea biofilmului bacterian, prin tehnica în plăci de microtitrare, s-au folosit două tulpini de *E. coli* (CP7921 notată în continuare C1 și DK0336 notată în continuare drept C2) și două tulpini de *S. aureus* (CO0587 notată în continuare drept S1 și CP7438 notată în continuare drept S2).

Pentru evaluarea activității antimicrobiene a celor cinci E, prin metoda disc-difuzimetrică, în plus față de tulpinile mai sus amintite, s-au utilizat: *E. coli* DM3527, *E. coli* CO1165, *E. coli* CO1453, *E. coli* CU0181, *S. aureus* CL9002 și *S. aureus* CP7170.

Toate tulpinile bacteriene au provenit din banca de tulpini bacteriene multirezistente inițiată în prima etapă a acestui proiect.

Tulpinile au fost „revigorată” prin creștere peste noapte în bulion cord-creier (BHI), la 37°C și ulterior au fost trecute pe agar cu sânge și incubate la 37°C, 24 ore.

Inoculul (I) a fost ajustat la 1.5×10^8 ufc/ml (etalonul McFarland 0.5) prin dizolvarea completă a unei singure colonii de dimensiuni mari, în cazul tulpinilor de stafilococ și a una-două colonii, în cazul tulpinilor de *E. coli*, în 10 ml bulion BHI.

Tehnica de lucru

2.4. Tehnica microdiluțiilor în bulion

Metoda microdiluțiilor în bulion este una dintre cele mai utilizate tehnici în evaluarea susceptibilității la antimicrobiene (Reller LB et. al. 2009, Thielmann J. et. al., 2019). Procedeele implică testarea activității agentului antimicrobian, la diferite concentrații, într-un mediu de creștere lichid (inocul bacterian) distribuit în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri, în cazul de față, plăci cu fund plat, clar, având un volum utilizabil de 200 μ l (Corning® Primaria™ 96-well Clear Flat Bottom Microtest Microplate, with Lid, Sterile).

Pentru minimalizarea efectului de margine, godeurile marginale au fost inoculate cu 200 μ l ser fiziologic (Shukla S. et. al., 2017). După incubarea la 37°C, 24 ore, turbiditatea a fost măsurată la cititorul Tecan, la o lungime de undă de 590 nm.

Pentru testarea UE, distribuirea în plăci s-a făcut conform Tabelului 1, iar pentru testarea E, conform Tabelelor 2, 3 și 4. În cazul uleiurilor esențiale, s-au folosit opt plăci, câte două pentru fiecare tulpină (una pentru fiecare ulei), iar în cazul extractelor, șase plăci: una pentru martori (Tabel 2), una pentru a cele patru tulpini în contact cu alcoolul 80% (Tabel 3) și patru, pentru fiecare tulpină bacteriană și cele cinci extracte (Tabel 4).

Tabel 1. Dispunerea în plăci pentru testarea uleiurilor esențiale

ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser
ser	BHI (B)	I	I 106 μ l + 4 μ l UE (IUE)	I 102 μ l + 8 μ l UE	I 100 μ l + 10 μ l UE	B 106 μ l + 4 μ l UE (BUE)					ser
ser	110 μ l	110 μ l									ser
ser						B 102 μ l + 8 μ l UE					ser
ser											ser
ser											ser
ser											ser
ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser

Se calculează media aritmetică a B și se scade această valoare din fiecare I, după care se calculează media și deviația standard pentru valorile obținute, aceasta reprezentând CONTROLUL.

Activitatea optică a controlului este considerată a fi rata de potență / creștere de 100%.

Pe același principiu ca mai sus, densitatea optică a inoculului în contact cu diferite concentrații de ulei esențial (T), se obține scăzând din fiecare IUE, media obținută pentru cele patru godeuri BUE.

Se presupune ca uleiul esențial va inhiba creșterea microbiană, iar PROCENTUL DE INHIBIȚIE (PI) corespunzător fiecărui volum de ulei folosit, se va calcula după formula:

$$PI\% = 100 - [(T \times 100) / C]$$

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

Tabel 2. Dispunerea în placă a martorilor, pentru testarea extractelor vegetale

ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser
ser	BHI (B) 150 μ l										ser
ser	Alcool 80% (A) 150 μ l										ser
ser	E1 10 μ l + A 140 μ l (AE1)	E2 10 μ l + A 140 μ l (AE2)	E3 10 μ l + A 140 μ l (AE3)	E4 10 μ l + A 140 μ l (AE4)	E5 10 μ l + A 140 μ l (AE5)						ser
ser											ser
ser											ser
ser											ser
ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser

Tabel 3. Dispunerea în placă a inoculului bacterian, în contact cu alcoolul, pentru testarea extractelor vegetale

ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser
ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser
ser	C1 140 μ l + 10 μ l A (C1A)										ser
ser	C2 140 μ l + 10 μ l A (C2A)										ser
ser	S1 140 μ l + 10 μ l A (S1A)										ser
ser	S2 140 μ l + 10 μ l A (S2A)										ser
ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser
ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser

Tabel 4. Dispunerea în plăci a inoculului bacterian, în contact cu extractele vegetale (o tulpină/placă)

ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser
ser	Inocul (I C/S) 150 μ l										ser
ser	E1 10 μ l + I 140 μ l (IE1)										ser
ser	E2 10 μ l + I 140 μ l (IE2)										ser
ser	E3 10 μ l + I 140 μ l (IE3)										ser
ser	E4 10 μ l + I 140 μ l (IE4)										ser
ser	E5 10 μ l + I 140 μ l (IE5)										ser
ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser	ser

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

În mod similar cu modul de calcul aplicat la uleiurile esențiale, se vor scădea martorii, astfel încât să se obțină valorile controalelor și ale inoculului în contact cu extractele:

- CONTROL (C1, C2, S1, S2) = I C/S - B;
- C/SA final = C/SA - (B+A);
- IE final = IE - (B+AE).

Pentru calcularea procentului de inhibiție final al fiecărui extract, se va scădea procentul de inhibiție al alcoolului, pentru fiecare tulpină bacteriană.

2.5. Tehnica în plăci de microtitrare pentru evaluarea biofilmului bacterian

Modul de lucru și de calcul este similar celui descris la tehnica microdiluțiilor în bulion. După ce s-a efectuat citirea absorbantelor la 24 ore de incubare, plăcile s-au reintrodus la termostat pentru încă 48 ore. După expirarea timpului, godeurile s-au golit de conținut și s-au spălat cu 200 μ l ser fiziologic. S-a colorat cu 170 μ l cristal violet 1%, timp de 10 minute (cu foarte mare atenție, astfel încât să nu ajungă stropi de colorant pe pereții godeului, în partea superioară), s-a golit colorantul și s-a spălat de 2 ori cu 200 μ l ser fiziologic. S-a decolorat cu alcool 96% 175 μ l, timp de 30 minute, apoi s-a citit absorbanta la o lungime de undă de 540 nm.

2.6. Metoda disc-difuzimetrică

În plăci cu agar Muller-Hinton, din inoculul adus la 0.5 McFarland, s-a însămânțat prin epuizare, cu ajutorul unui tampon steril, conform protocolului propus de EUCAST. Înainte de aplicarea microcomprimatelor din hârtie de filtru, plăcile au fost lăsate în repaus maxim 15 minute, pentru înglobarea inoculului și zvântarea suprafeței.

Microcomprimetele, cu diametrul de 6 mm, au fost confecționate din hârtie de filtru (Prat Dumas pentru plăci de 90 mm, viteză de filtrare medie 108)(Ashraf A.M. et. al., 2018).

Pe o placă au fost repartizate șase microcomprimete: 1 - busuioc, 2 - leurdă, 3 - salcâm, 4 - coada calului, 5 - pelin, 6 - alcool 80%.

Microcomprimetele au fost îmbibate cu 7 și 10 μ l extract și alcool, în două moduri:

- direct în placa inoculată;
- microcomprimetele au fost întâi îmbibate și ulterior, dispuse în placă.

3. Rezultate și discuții

3.1. Testarea acțiunii antimicrobiene a unor uleiuri esențiale

3.1.1. Acțiunea uleiului esențial de busuioc

Uleiul esențial de busuioc a avut efect inhibitor variabil asupra tulpinilor luate în studiu, dependent de volumul utilizat, procentele de inhibiție oscilând între 92,11 și 99,15%, față de control.

În cazul tulpinilor de *E. coli*, se constată că pe măsură ce crește volumul uleiului esențial de busuioc de la 4 μ l la 10 μ l, densitatea celulară bacteriană se reduce (Tabelul 5 și Figura 2). Activitatea optică a controlului este considerată a fi rata de potență de 100% și comparativ cu aceasta, se poate observa o inhibare a dezvoltării tulpinilor Gram negative, cu 92,11% până la 99,15% (Tabelul 5 și Figura 3).

Și cazul tulpinilor de *S. aureus*, creșterea volumului uleiului esențial de busuioc de la 4 μ l la 10 μ l a dus la reducerea densității celulare bacteriene (Tabelul 5 și Figura 4). Comparativ cu controlul, se observă o inhibare a dezvoltării tulpinilor Gram pozitive, cu 93,39% până la 97,37% (Tabelul 5 și Figura 5).

La tulpina *E. coli* CP7921, se constată o corelație negativă moderată între volumul de ulei adăugat și densitatea celulară bacteriană, semnificativă din punct de vedere statistic $r(21) = -0.53961$, $p=0,0079$ (Figura 6). La tulpina *E. coli* DK0336, corelația negativă este slabă și nesemnificativă din punct de vedere statistic $r(28) = -0.2817$, $p=0.147$ (Figura 7).

În cazul tulpinii *S. aureus* C00587, așa cum reiese și din Tabelul 5, procentul de inhibiție este mai scăzut la volumul de 8 μ l, comparativ cu cel de 4 și 10 μ l, astfel că între densitatea bacteriană și volumul de ulei nu a putut fi stabilită vreo corelație $r(24) = -0.081$. La tulpina *S. aureus* CP7438, în schimb, corelația negativă dintre cele două variabile este puternică și semnificativă din punct de vedere statistic $r(23) = -0.79934$, $p<0.00001$ (Figura 8).

Astfel, în cazul uleiului esențial de busuioc, densitatea celulară bacteriană scade și procentul de inhibiție crește, cu creșterea volumului de ulei, atât în cazul tulpinilor Gram negative, cât și în cazul celor Gram pozitive.

3.1.2. Acțiunea uleiului esențial de cuișoare

Uleiul esențial de cuișoare a avut efect inhibitor variabil asupra tulpinilor luate în studiu, dependent de volumul utilizat, procentele de inhibiție oscilând între 84,27 și 94,73% față de control.

Atât în cazul tulpinilor de *E. coli*, cât și în cazul celor de *S. aureus*, se constată că pe măsură ce crește volumul uleiului esențial de la 4 μ l la 10 μ l, densitatea celulară bacteriană crește și ea (Tabelul 5, Figura 2 și Figura 4). Comparativ cu controlul, se observă o inhibare a dezvoltării tulpinilor Gram negative, cu 89,46% până la 94,73% și a celor Gram pozitive, cu 84,27 până la 93,65% (Tabelul 5, Figura 3 și Figura 5).

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

La tulpina *E. coli* CP7921, se constată o corelație pozitivă moderată între volumul de ulei adăugat și densitatea celulară bacteriană, semnificativă din punct de vedere statistic $r(24) = 0.7185$, $p=0,00003$ (Figura 9). La tulpina *E. coli* DK0336, corelația pozitivă este slabă și nesemnificativă din punct de vedere statistic $r(21) = 0.3136$, $p=0.145$ (Figura 10).

În cazul tulpinii *S. aureus* CO0587, între densitatea bacteriană și volumul de ulei, s-a stabilit o corelație pozitivă puternică $r(19) = 0.9260$, $p<0.00001$ (Figura 11). La tulpina *S. aureus* CP7438, corelația pozitivă dintre cele două variabile este slabă, dar semnificativă din punct de vedere statistic $r(22) = 0.4058$, $p=0.0491$ (Figura 12).

Astfel, în cazul uleiului esențial de cuișoare, densitatea celulară bacteriană crește și procentul de inhibiție scade, cu creșterea volumului de ulei, atât în cazul tulpinilor Gram negative, cât și în cazul celor Gram pozitive.

Din datele prezentate în Tabelul 5, se constată o dezvoltare variabilă a controalelor de *E. coli*, în funcție de uleiul esențial folosit. Astfel, același control (tulpină), s-a dezvoltat mai slab în plăcile în care s-a testat uleiul esențial de busuioc, comparativ cu cele în care s-a testat cel de cuișoare. Acest fapt sugerează că, în cazul uleiului esențial de busuioc, compuşii volatili rezultați prin evaporare din godeurile în care s-a adăugat ulei, s-au resolubilizat în godeurile cu tulpina-control, inhibând într-o anumită măsură și dezvoltarea acesteia. Aceeași tendință se constată și în cazul tulpinilor Gram pozitive, între diferențele nu sunt la fel de mari (Tabelul 5).

Tabel 5. Valorile medii ale absorbanțelor, deviațiile standard și procentele de inhibiție, în urma testării uleiurilor esențiale de busuioc și cuișoare

		C CP7921		C DK0336		S CO0587		S CP7438	
		busuioc	cuișoare	busuioc	cuișoare	busuioc	cuișoare	busuioc	cuișoare
CONTROL	Medie	0.34944	0.628162	0.242153	0.552508	0.465269	0.503258	0.5094	0.633261
	DS	0.09376	0.017045	0.033482	0.054276	0.017676	0.031977	0.047098	0.006597
4μL	Medie	0.009346	0.0331	0.019099	0.032259	0.013276	0.031942	0.033642	0.085108
	DS	0.00206	0.016877	0.013126	0.014905	0.004685	0.004371	0.00779	0.016467
	PI %	97.32548	94.73066	92.11288	94.1614	97.14661	93.65303	93.39582	86.56031
8 μL	Medie	0.006577	0.03844	0.014611	0.040305	0.014646	0.055062	0.024425	0.093219
	DS	0.005119	0.011863	0.017541	0.021458	0.003026	0.008674	0.006276	0.014862
	PI %	98.11794	93.88056	93.96637	92.70513	96.85218	89.05892	95.20514	85.27946
10 μL	Medie	0.002943	0.066156	0.009622	0.047011	0.012225	0.065242	0.014018	0.099562
	DS	0.001083	0.011517	0.001803	0.021219	0.001698	0.004541	0.003556	0.010292
	PI %	99.1577	89.4684	96.02638	91.49133	97.37249	87.03615	97.24822	84.27781

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

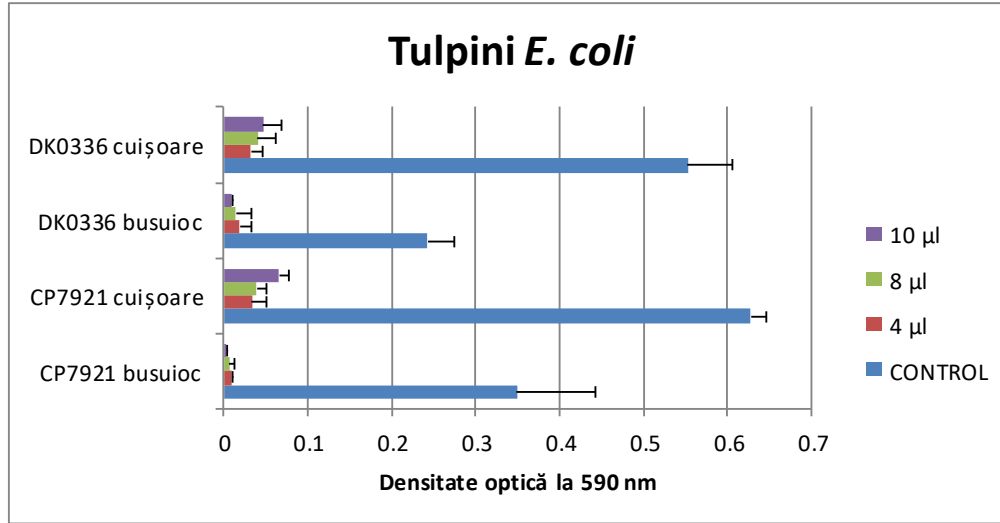


Figura 2. Media determinărilor și deviația standard pentru controale și cele trei concentrații testate, la tulpinile de *E. coli*

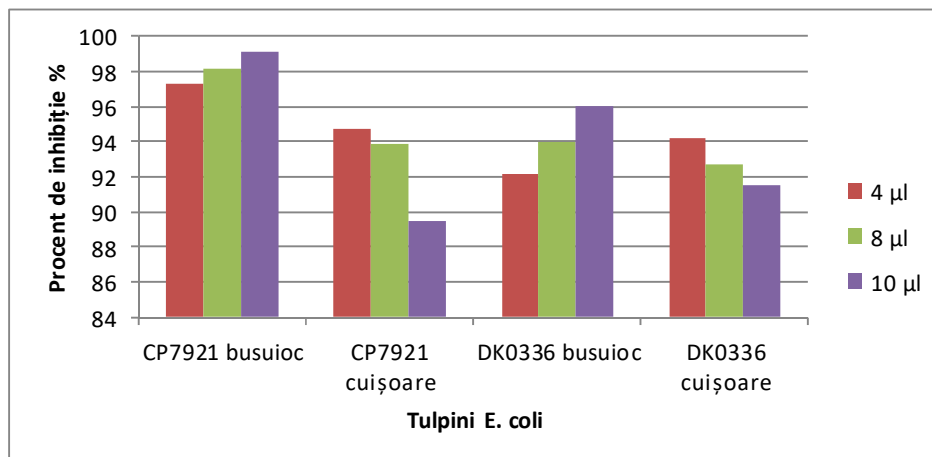


Figura 3. Procentele de inhibiție ale celor trei concentrații testate, asupra tulpinilor de *E. coli*

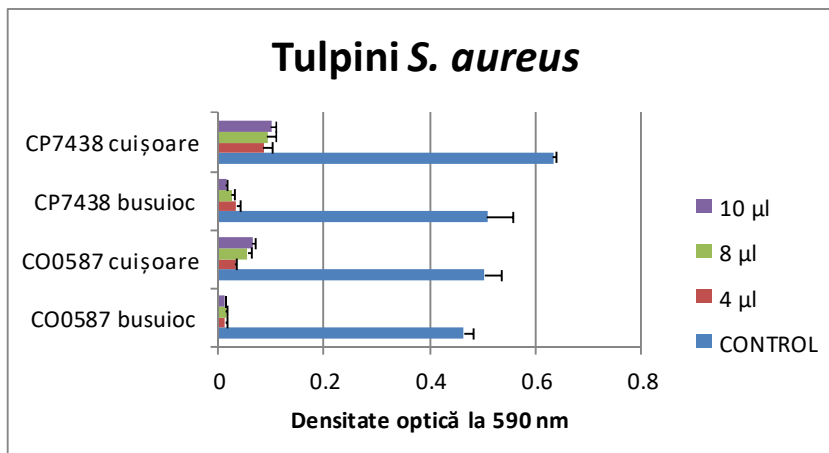


Figura 4. Media determinărilor și deviația standard pentru controale și cele trei concentrații testate, la tulpinile de *S. aureus*

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

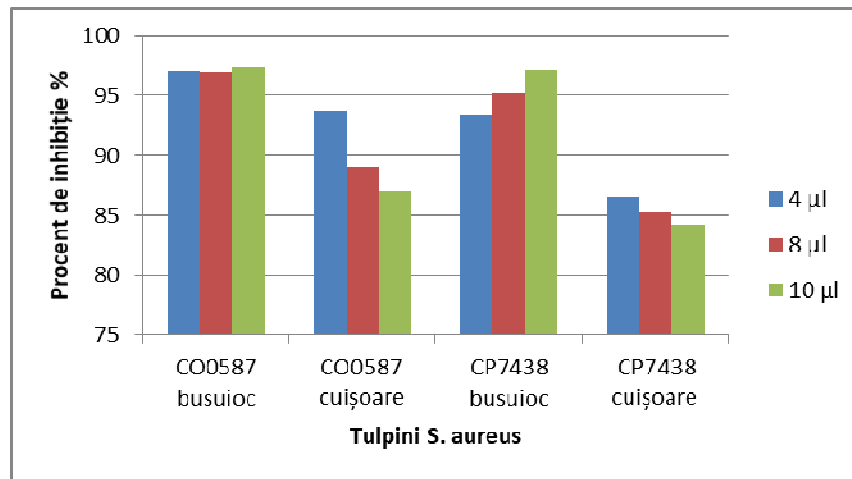


Figura 5. Procentele de inhibiție ale celor trei concentrații testate, asupra tulpinilor de *S. aureus*

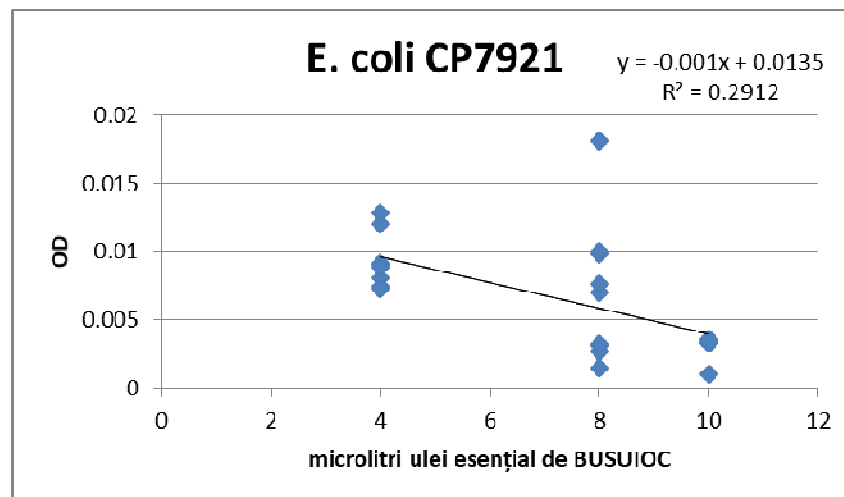


Figura 6. Corelație negativă moderată între densitatea celulară bacteriană și volumul de ulei esențial

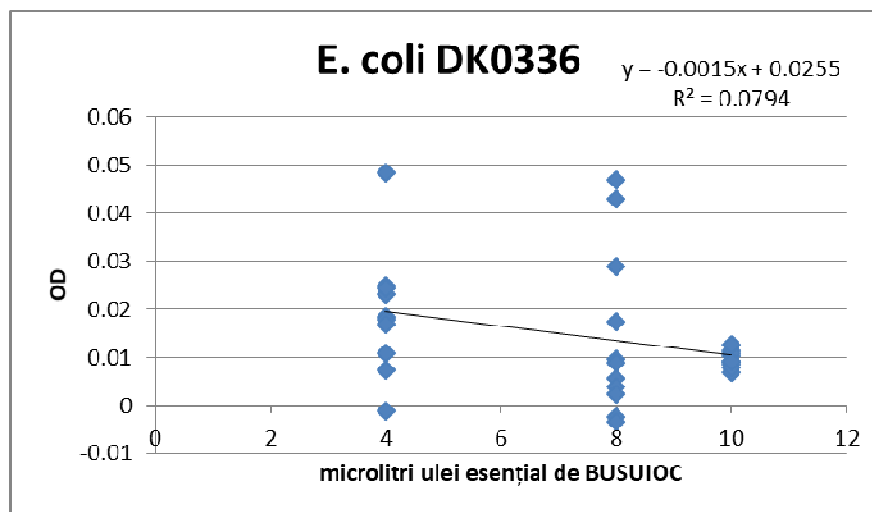


Figura 7. Corelație negativă slabă între densitatea celulară bacteriană și volumul de ulei esențial

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

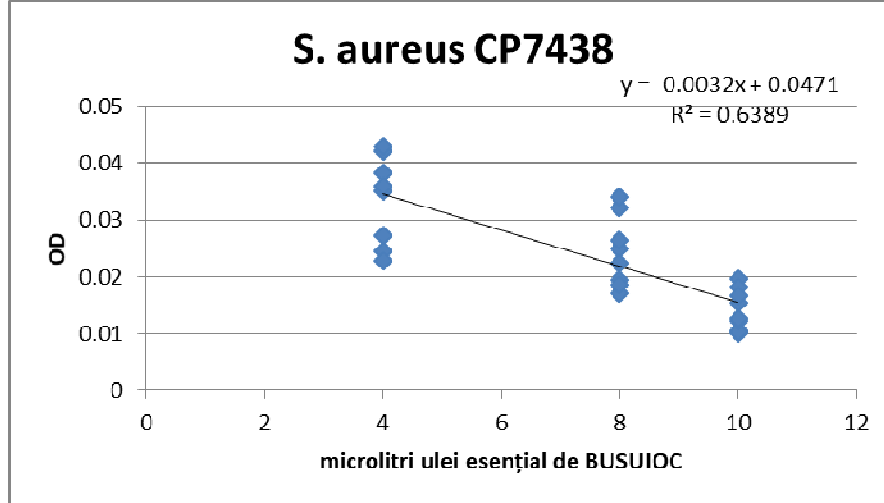


Figura 8. Corelație negativă puternică între densitatea celulară bacteriană și volumul de ulei esențial

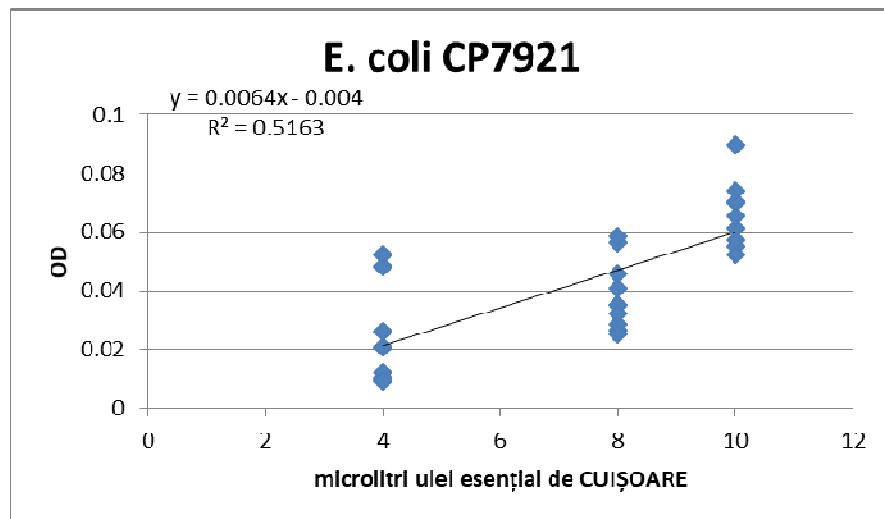


Figura 9. Corelație pozitivă moderată între densitatea celulară bacteriană și volumul de ulei esențial

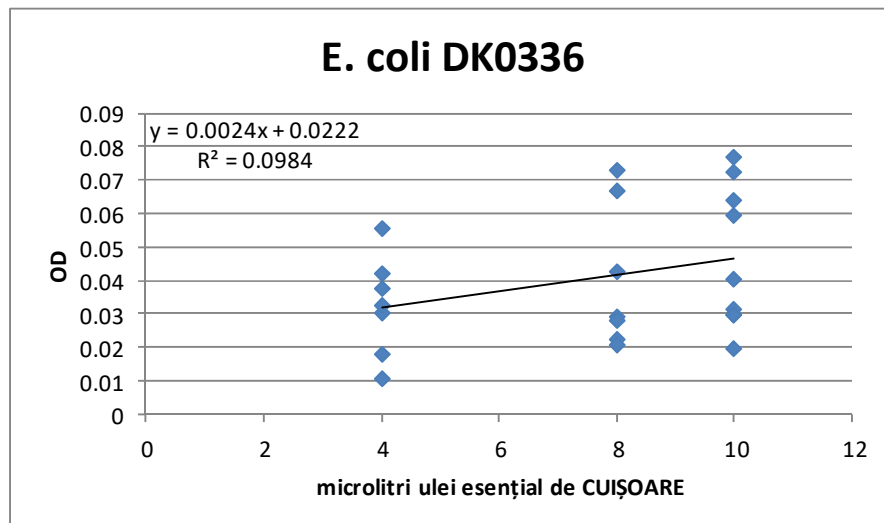


Figura 10. Corelație pozitivă slabă între densitatea celulară bacteriană și volumul de ulei esențial

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

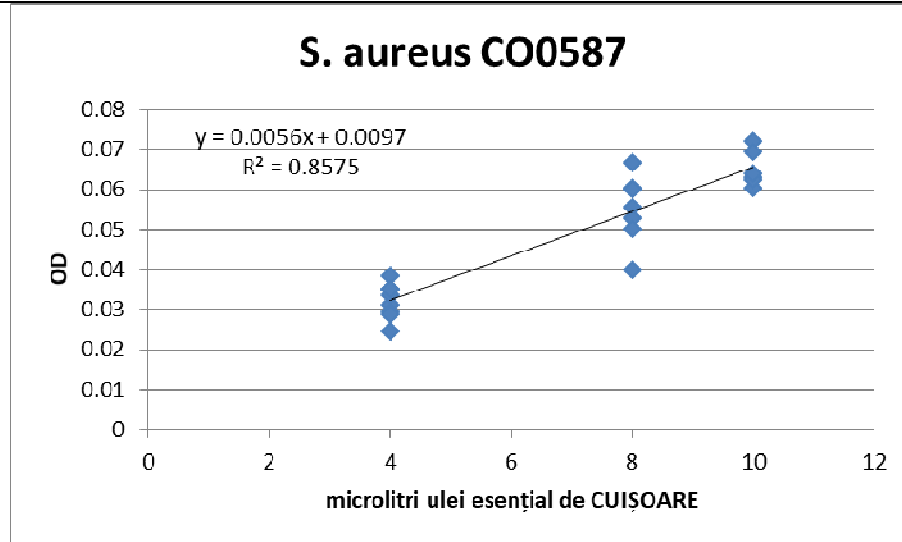


Figura 11. Corelație pozitivă puternică între densitatea celulară bacteriană și volumul de ulei esențial

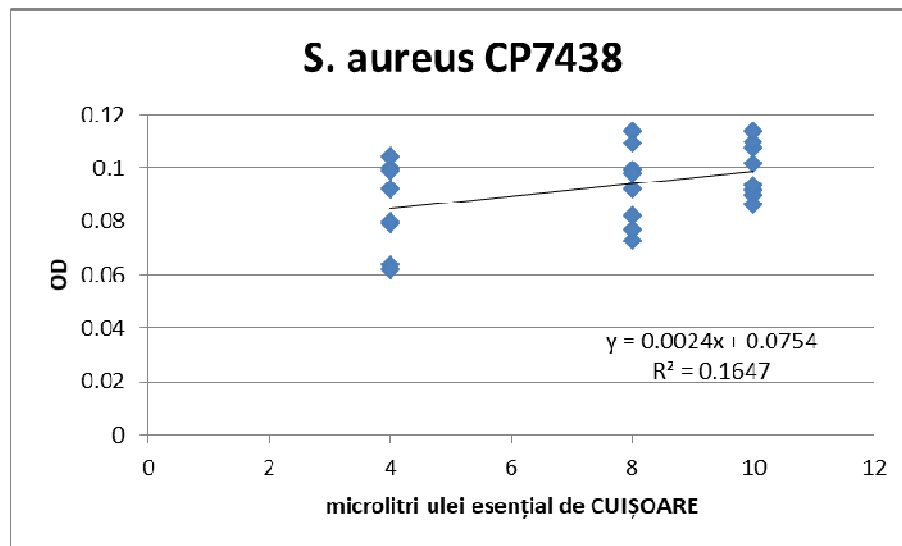


Figura 12. Corelație pozitivă slabă între densitatea celulară bacteriană și volumul de ulei esențial

3.2. Testarea acțiunii antimicrobiene a unor extracte vegetale

Din Tabelul 6, se constată că alcoolul 80%, testat singur, a avut efect inhibitor variabil asupra creșterii bacteriene, de la 9,93 până la 31,64%, mai redus în cazul tulpinilor Gram pozitive, decât în cazul celor Gram negative. Drept urmare, pentru a calcula procentele finale de inhibiție, adică a surprinde doar acțiunea extractelor asupra creșterii bacteriene, din fiecare valoare s-a scăzut procentul de inhibiție al alcoolului, iar rezultatele sunt redată în Tabelul 6 și grafic, în Figura 14.

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

Tabel 6. Valorile medii ale absorbanțelor, deviațiile standard și procentele de inhibiție, în urma testării activității antimicrobiene a cinci extracte vegetale

		C CP7921	C DK0336	S C00587	S CP7438
CONTROL	Medie	0.886968	0.718183	0.58273	0.615982
	DS	0.006748	0.017804	0.012275	0.004601
alcool 80%	Medie	0.763907	0.490908	0.524835	0.54408
	DS	0.018175	0.052793	0.006704	0.040201
	PI%	13.8743	31.64586	9.93501	11.67286
busuioc	Medie	0.682898	0.588137	0.095937	0.072203
	DS	0.012312	0.005067	0.029894	0.081564
	PI%	23.00763	18.10763	83.53667	88.27835
	- alcool%	9.133328	-13.5382	73.60166	76.60549
leurdă	Medie	0.406792	0.315609	0.282213	0.331187
	DS	0.028258	0.049084	0.021005	0.029515
	PI%	54.13677	56.0545	51.57049	46.2344
	- alcool%	40.26247	24.40865	41.63548	34.56154
salcâm	Medie	0.509919	0.458422	0.398797	0.399027
	DS	0.011991	0.031765	0.032327	0.020505
	PI%	42.5099	36.1692	31.56402	35.2211
	- alcool%	28.63559	4.52334	21.62901	23.54824
coada calului	Medie	0.61367	0.484092	0.064099	0.049309
	DS	0.010647	0.020229	0.013887	0.008719
	PI%	30.81262	32.59482	89.00015	91.99508
	- alcool%	16.93832	0.948963	79.06514	80.32222
pelin	Medie	0.589698	0.505585	0.238452	0.331194
	DS	0.029956	0.017616	0.014508	0.017961
	PI%	33.51534	29.60212	59.08017	46.23328
	- alcool%	19.64103	-2.04374	49.14516	34.56041

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

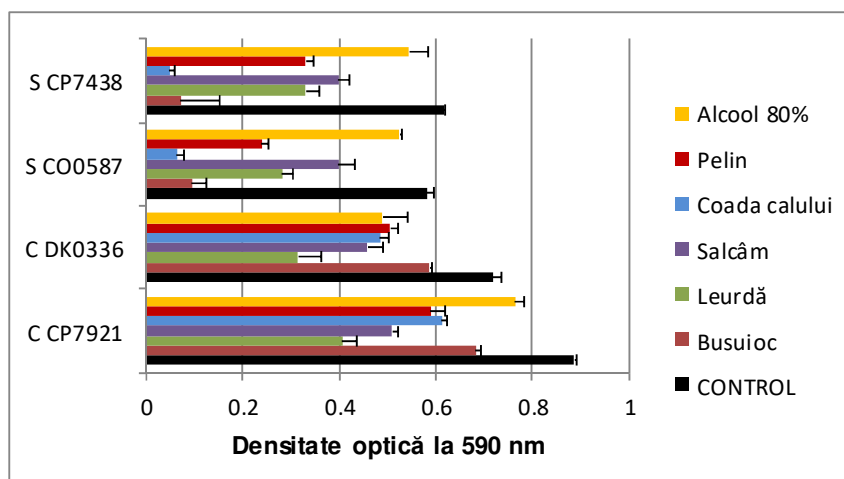


Figura 13. Media determinărilor și deviația standard pentru controale, cele cinci extracte testate și pentru alcoolul 80%

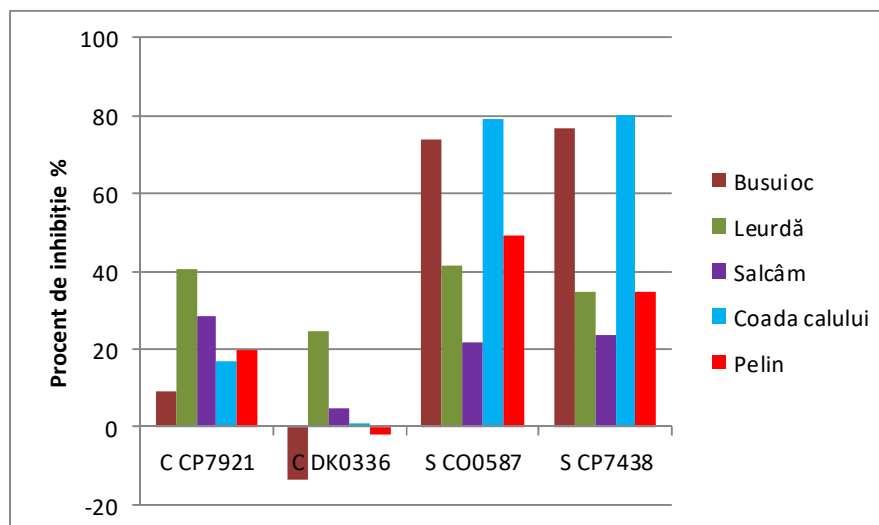


Figura 14. Procentele de inhibiție ale extractelor vegetale, asupra tulpinilor testate

În cazul tulpinii *E. coli* DK0336, se observă că alcoolul singur a avut un efect inhibitor mai mare decât extractul alcoolic de busuioc și pelin. Aceasta se poate datora fie faptului că principii activi conținuți în aceste plante, au potențat creșterea microbiană, în cazul acestei tulpini (puțin probabil), fie continuării extracției pe parcursul incubării (din cauză că extractele nu au fost filtrate înainte de utilizare, din dorința menținerii sterilității, în lipsa unor filtre potrivite și sterile) și influențării densității optice finale.

În cazul tulpinilor Gram negative, niciun extract nu a determinat un procent de inhibiție mai mare de 50%. Cele mai ridicate activități inhibitorii le-au manifestat leurda (40,26%) și salcâmul (28,63%), asupra tulpinii C1 și leurda (24,40%) asupra tulpinii C2.

Extractele de busuioc și coada calului au avut efecte inhibitorii considerabile asupra tulpinilor Gram pozitive, cu procente de inhibiție de peste 70%. Dintre acestea, efectele extractului de coada calului au fost mai pronunțate (79,06% și 80,32%) (Figura 14). Extractul de pelin a determinat o inhibare a creșterii tulpinilor Gram pozitive cu 49,14 și

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni
 34,560% față de control, iar extractul de leurdă, cu 41,63 și 34,561%. Controalele s-au dezvoltat mai bine, comparativ cu uleiurile esențiale și în special, tulpinile de *E. coli*.

3.3. Testarea capacității unor extracte vegetale de a inhiba formarea biofilmului bacterian

Tabel 7. Valorile medii ale absorbanțelor, deviațiile standard și procentele de inhibiție, în urma testării capacității a cinci extracte vegetale și a alcoolului 80% de a inhiba formarea biofilmului bacterian

		C CP7921	C DK0336	S C00587	S CP7438
CONTROL	Medie	0.895764	0.409045	0.090599	2.483219
	DS	0.052181	0.078214	0.017782	0.100105
busuioc	Medie				1.716316
	DS				0.322559
	PI%				30.88339
leurdă	Medie	0.339872	0.194702	0.635102	0.942657
	DS	0.041229	0.052167	0.301988	0.237306
	PI%	62.05791	52.40092	+ 85.7348	62.03889
salcâm	Medie	0.26962	0.1245	0.08488	0.783096
	DS	0.011382	0.071321	0.037696	0.151491
	PI%	69.90055	69.56316	6.312341	68.46446
coada calului	Medie	0.063924		0.100409	0.218619
	DS	0.056841		0.027243	0.100869
	PI%	92.86372		+9.770416	91.19614
pelin	Medie				0.358383
	DS				0.132723
	PI%				85.56781
alcool 80%	Medie	0.817963	0.107585	0.142552	0.078957
	DS	0.039149	0.037228	0.029622	0.035074
	PI%	8.685476	73.69847	+ 36.4452	96.82036

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

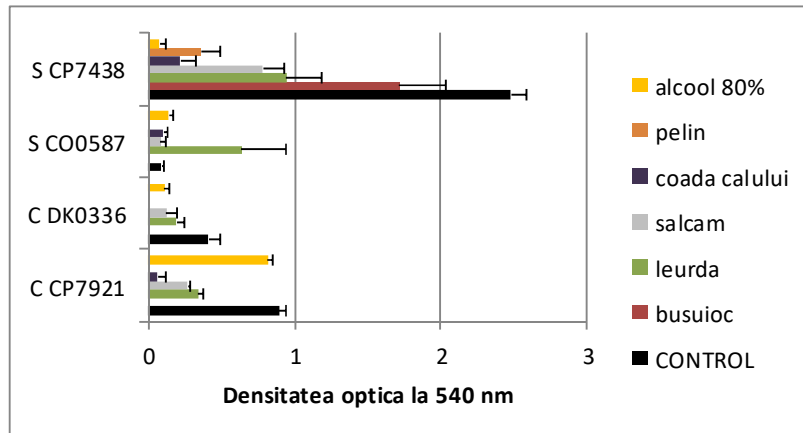


Figura 15. Media determinărilor și deviația standard pentru controale, cele cinci extracte testate și pentru alcoolul 80%

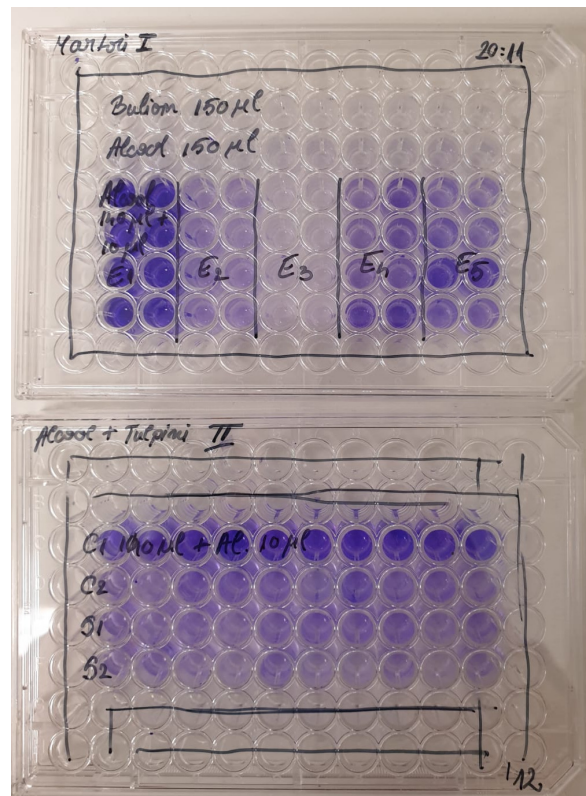


Figura 16

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

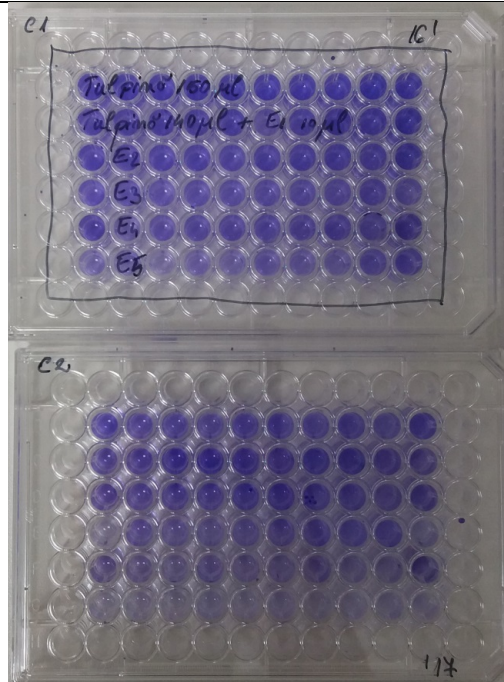


Figura 17

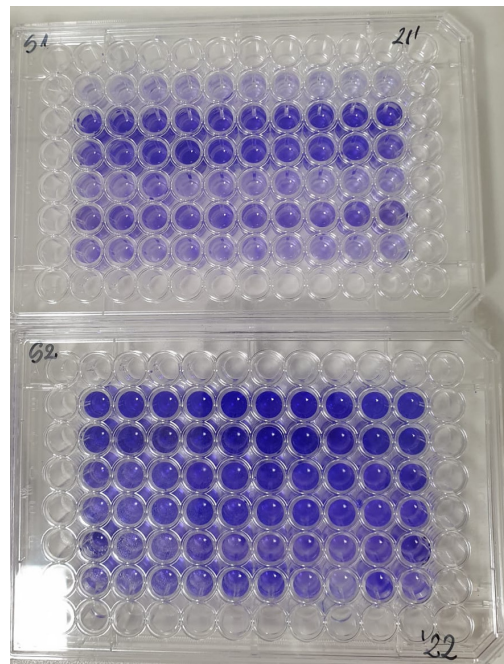


Figura 18

Rezultatele neomogene obținute pledează pentru reconsiderarea metodei de lucru. La E1 (busuioc), E5 (pelin) și parțial la E4 (coada calului), s-au constatat densități optice ale matorului (Figura 16) mai ridicate decât în cazul amestecului tulpină + extract (Figura 17 și 18), astfel încât rezultatele nu au putut fi validate (spațiile libere din Tabelul 7). Cauza poate fi aceeași ca și în cazul mai sus amintit (tulpina DK0336).

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

Pentru remedierea acestui neajuns, în viitor, se impune folosire ca martor a bulionului 140 μ l + extract 10 μ l sau solubilizarea extractelor în alt solvent decât alcoolul 80%.

În cazul tulpinii *S. aureus* CO0587, s-a constatat că extractele de leurdă, coada calului și chiar alcoolul, au stimulat formarea biofilmului bacterian, comparativ cu controlul (Tabelul 7 și Figura 15), rezultate similare obținând și alte colective de cercetători [3]. În cazul celorlalte tulpini, alcoolul 80% a inhibat în procente variabile, de la 8,68 până la 96,82%, formarea biofilmului.

Comparativ cu testarea activității antimicrobiene a extractelor și a uleiurilor esențiale, se observă că în cadrul acestui protocol, deviațiile standard sunt mai mari, ceea ce sugerează o creștere bacteriană neomogenă și/sau prezența reziduurilor vegetale, care au aderat pe fundul godeurilor și nu au putut fi îndepărtate prin spălare. Aceste reziduuri au fost evidente în cazul extractului de busuioc, pelin și parțial în cazul celui de coada calului, întrucât TOATE tulpinile, inclusiv cele de stafilococi, au format biofilmul pe pereții godeurilor.

Din procentul de inhibiție atribuit extractelor, nu s-a mai putut extrage procentul de inhibiție datorat alcoolului, întrucât acesta din urmă a fost în multe situații, mai ridicat.

3.4. Testarea acțiunii antimicrobiene a unor extracte vegetale prin metoda disc-difuzimetrică

Când microcomprimatele din hârtie de filtru au fost întâi dispuse în placă și ulterior, îmbibate, indiferent de volumul folosit, extractul a difuzat, iar zona de inhibiție a fost în toate cazurile mai mică sau cel mult egală, cu zona de difuzie (Figura 19 și discurile 4 și 5 din Figurile 20 și 21).

Când microcomprimatele au fost întâi îmbibate și ulterior, dispuse în placă, nu a existat zonă de inhibiție (Figurile 20 și 21).

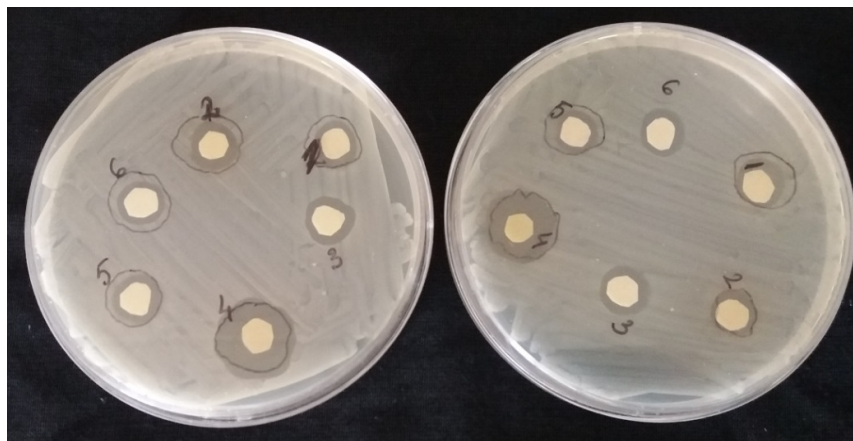


Figura 19

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

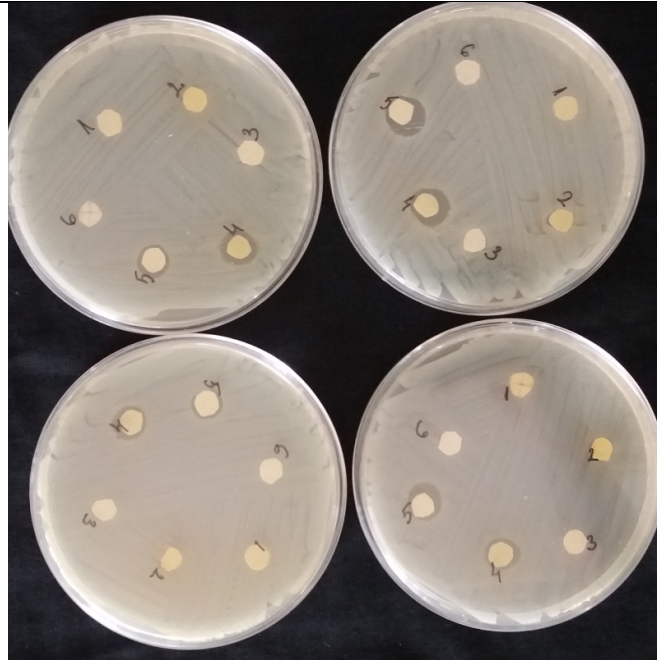


Figura 20

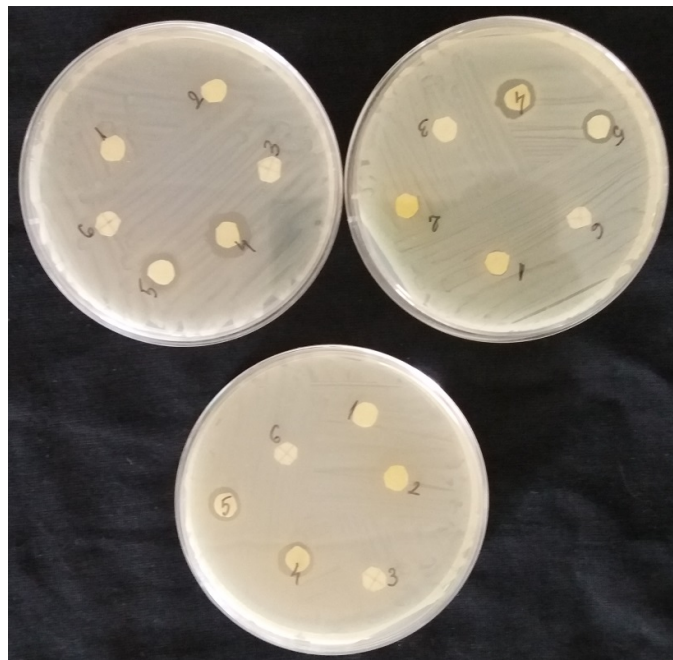


Figura 21

4. Concluzii și abordări viitoare

4.1. Acțiunea antimicrobiană a unor uleiuri esențiale

- Uleiurile esențiale de busuioc și cuișoare au avut efecte inhibitorii considerabile (procente de inhibiție de peste 80%) asupra tulpinilor luate în studiu.
- Uleiul esențial de busuioc are acțiune aproape la fel de bună asupra germenilor G+ și G-.
- Uleiul esențial de cuișoare este mai activ împotriva germenilor G-.
- În cazul uleiului esențial de busuioc, densitatea celulară bacteriană scade și procentul de inhibiție crește, cu creșterea volumului de ulei, atât în cazul tulpinilor Gram negative, cât și în cazul celor Gram pozitive; uleiul esențial de busuioc are activitate antibacteriană mai bună la concentrații mai mari.
- În cazul uleiului esențial de cuișoare, densitatea celulară bacteriană crește și procentul de inhibiție scade, cu creșterea volumului de ulei, atât în cazul tulpinilor Gram negative, cât și în cazul celor Gram pozitive; uleiul esențial de cuișoare are activitate antibacteriană mai bună la concentrații mai mici.

Abordări viitoare:

- Incubarea controalelor în plăci separate.
- Pentru uleiurile esențiale ale căror proprietăți antibacteriene sunt arhicunoscute (cum este cazul celor două testate de noi), să se pornească de la concentrații / volume mai mici, iar testarea să se facă din aproape în aproape (ex. 0.2 – 0.4 – 0.8 – 1 – 1.2 șamd μL) – MIC.
- Găsirea unor variante de emulsionare cât mai bună a uleiului în inoculul bacterian (sau identificarea compușilor activi din uleiuri prin metoda GS-MS, izolarea lor și încorporarea în alte baze, mai „miscibile” cu inoculul bacterian) și / sau verificarea efectului antimicrobian și prin însămânțare pe mediu solid și numărare – pentru a minimaliza erorile de citire care ar putea rezulta din neamestecarea omogenă a uleiului esențial cu inoculul bacterian.

4.2. Acțiunea antimicrobiană a unor extracte vegetale

- Extractul alcoolic de busuioc nu are efecte antimicrobiene la fel de bune ca și uleiul esențial; Efectele extractului asupra tulpinilor Gram negative sunt mult mai slabe decât asupra celor de *S. aureus*.
- Extractul alcoolic de coada calului a inhibat creșterea tulpinilor Gram pozitive cu aproximativ 80% față de control; Coada calului nu face parte din categoria plantelor ale căror efecte antimicrobiene au fost îndelung studiate și demonstrate (spre deosebire de busuioc), motiv pentru care aceasta merită a fi studiată în continuare.
- Extractele alcoolice de leurdă și pelin s-ar putea dovedi eficiente, încorporate în amestecuri antimicrobiene, în special împotriva lui *S. aureus*.

R. 2.5.1 Utilizarea modelului in vitro pentru testarea proprietăților altor agenți antimicrobieni

- Extractul alcoolic de salcâm s-ar putea dovedi eficient, încorporat în amestecuri antimicrobiene, în special împotriva lui *E. coli*.

Abordări viitoare:

- Folosirea altui solvent pentru realizarea extractelor.

4.3. Proprietatea unor extracte vegetale de a inhiba formarea biofilmului bacterian

- Se impune folosirea altui solvent pentru solubilizarea extractelor sau utilizarea în continuare a alcoolului 80%, dar filtrarea extractelor înainte de utilizare și înlocuirea alcoolului cu bulionul în conceperea martorilor pentru extracte.

4.4. Testarea activității antibacteriene a unor extracte vegetale prin metoda disc-difuzimetrică

- Pentru ca metoda să devină fezabilă, se vor folosi microcomprimate-blancuri comerciale, care să elibereze lent extractul în mediu ([Arrulapan S. et. al., 2009](#))

Bibliografie

- Akhtar M.S., Degaga B., Azam T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues Biol.Sci.Pharm.Res.*, 2 (1): 001-007
- Arullappan S, Zakaria Z, Basri DF. Preliminary Screening of Antibacterial Activity Using Crude Extracts of Hibiscus rosa sinensis. *Trop Life Sci Res.* 2009;20(2):109-118.
- Ashraf A. Mostafa, Abdulaziz A. Al-Askar, Khalid S. Almaary, Turki M. Dawoud, Essam N. Sholkamy, Marwah M. Bakri. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2018;25(2):361-366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>.
- Cordery A., Rao A.P., Ravishankar S. (2018) Antimicrobial Activities of Essential Oils, Plant Extracts and their Applications in Foods-A Review. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 7, 2: 76-89
- Demo M., M. de las M. Oliva, María L. López, María P. Zunino & Julio A. Zygadlo (2005) Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from Aromatic Plants of Argentina, *Pharmaceutical Biology*, 43:2, 129-134
- Gyorgy E. (2010) Study of the antimicrobial activity and synergistic effect of some plant extracts and essential oils. *Revista Română de Medicină de Laborator*, 18, 1/4: 49-56
- Luther MK, Bilida S, Mermel LA, LaPlante KL. Ethanol and Isopropyl Alcohol Exposure Increases Biofilm Formation in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. *Infect Dis Ther.* 2015;4(2):219-226. doi:10.1007/s40121-015-0065-y
- Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1749–1755.
- Shaaban HA. (2020). Essential Oil as Antimicrobial Agents: Efficacy, Stability, and Safety Issues for Food Application. In "Essential oils", OI: 10.5772/intechopen.87266, ISBN: 978-1-83962-698-2, Print ISBN: 978-1-83962-697-5, eBook (PDF) ISBN: 978-1-83962-699-9
- Shukla S, Toleti SR. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Micro-Titre Plate. 2017; 10.1101/100214
- Swamy M.K., Akhtar M.S., Sinniah U.R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 3012462, 21 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/301246>
- Thielmann J, Muranyi P, Kazman P. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon.* 2019;5(6):e01860.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing – EUCAST disk diffusion method. Version 7.0. 2019. Disponibil de pe: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf
- <https://fares.ro/produs/cuisoare-a7/>
- <https://life-bio.ro/produs/ulei-esential-de-busuioc-ultra/>