



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Malwina Brożyna

Rozprawa doktorska w oparciu o monotematyczny cykl publikacji w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Określenie zdolności wybranych olejków eterycznych do eradykacji biofilmu tworzonego przez drobnoustroje izolowane z zakażeń kości i ran

Determination of the ability of selected essential oils to eradicate biofilm formed by microorganisms isolated from bone and wound infections

*Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu*

Promotor:
dr hab. n. med. Adam Feliks Junka, prof. UMW

Promotor pomocniczy:
dr n. farm. Ruth Dudek-Wicher

Wrocław 2023

STRESZCZENIE

Rozprzestrzenianie się wśród drobnoustrojów mechanizmów oporności na antybiotyki prowadzi do istotnego obniżenia ich skuteczności oraz stanowi globalne zagrożenie dla ochrony zdrowia. Ze względu na niewielką liczbę wdrażanych antybiotyków, prowadzone są obecnie intensywne prace nad wprowadzeniem nieantybiotykowych środków terapeutycznych mających służyć zwalczaniu infekcji.

Infekcje powodowane przez biofilmy *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* są jednym z najczęstszych powikłań niegojących się ran i zakażeń kości. Biofilm cechuje się wysoką tolerancją na konwencjonalne środki przeciwdrobnoustrojowe (antybiotyki, środki antyseptyczne, dezynfekujące), mechanizmy obrony immunologicznej człowieka oraz czynniki zewnętrzne. Jednym z rozwiązań proponowanych do zwalczania zakażeń wywołanych obecnością biofilmów jest zastosowanie olejków eterycznych. Cechują się one silnymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi i przeciwbiofilmowymi. Jednakże metodyki oceny ich działania wobec drobnoustrojów charakteryzują się wysokim stopniem niespójności. Metody te nie odzwierciedlają również warunków panujących w miejscu infekcji, przez co w ograniczonym tylko stopniu określają rzeczywistą aktywność olejków eterycznych w warunkach *in vivo*.

Celem pracy było opracowanie testu służącego ocenie aktywności przeciwbiofilmowych lotnych związków, ocena *in vitro* właściwości przeciwdrobnoustrojowych i przeciwbiofilmowych olejków eterycznych oraz określenie wpływu składu medium hodowlanego na cechy biofilmu i skuteczność przeciwdrobnoustrojową olejków eterycznych.

Badaniom poddano szczepy wzorcowe i kliniczne *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* izolowane z zakażeń kości i ran. Testowano siedem olejków eterycznych pochodzących ze źródeł komercyjnych. Drobnoustroje hodowano w standardowej pożywce mikrobiologicznej lub w medium imitującym środowisko niegojącej się rany. Analizowano właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwbiofilmowe frakcji płynnych i lotnych olejków wykorzystując metodologie standardowe oraz autorską metodę badawczą.

Otrzymane wyniki wykazały, iż opracowana metodologia badawcza pozwala na ocenę właściwości przeciwbiofilmowych lotnych substancji, w tym olejków eterycznych. Olejki tymiankowy i rozmarynowy cechowały się najwyższą efektywnością przeciwdrobnoustrojową względem badanych patogenów. Skład medium hodowlanego wpływał na cechy strukturalne i funkcjonalne biofilmu, a tym samym na poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej testowanych związków. Wrażliwość na olejki eteryczne komórek w formie planktonicznej była niższa w medium imitującym środowisko rany niż w standardowej pożywce hodowlanej, natomiast na poziom wrażliwości biofilmów wpływ miał także zastosowany układ badawczy oraz rodzaj użytego olejku.

W celu właściwej oceny skuteczności przeciwdrobnoustrojowej olejków eterycznych niezbędna jest standaryzacja metodologii badawczej *in vitro*, szczególnie w odniesieniu do analizy aktywności frakcji lotnych. Stosowany układ badawczy powinien odzwierciedlać warunki panujące w miejscu infekcji.

ABSTRACT

The spreading of antibiotic resistance mechanisms among microorganisms significantly reduces their effectiveness and threatens public health care worldwide. As the number of newly implemented antibiotics is limited, efforts are being undertaken to introduce non-antibiotic therapeutic agents for combating infections.

The major causative factors of non-healing wounds and bone infections are *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Biofilms are specific microbial structures exhibiting high tolerance to antimicrobials (antibiotics, antiseptics, disinfectants), human immune defense mechanisms, and environmental factors.

Essential oils [EOs] are considered a promising therapeutic option for treating biofilm-related infections. Potent antimicrobial and antibiofilm properties characterize these plant-derived substances. However, the *in vitro* methodologies for assessing their antimicrobial activity are inconsistent and do not reflect the conditions at the site of infection. Therefore, the results of these methods do not provide the data of EOs *in vivo* effect.

The aim of the present study was to develop a test to evaluate the antibiofilm effectiveness of volatile compounds, assess *in vitro* the antimicrobial and antibiofilm properties of EOs, and determine the effect of the composition of culture medium on biofilm features and antimicrobial activity of EOs.

Standard and clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bone and wound infections were tested. Seven EOs from commercial sources were analyzed. The microorganisms were cultured in a standard microbiological medium or a medium imitating a non-healing wound milieu. The antimicrobial and antibiofilm activity of liquid and volatile fractions of EOs was evaluated using standard methodologies and a self-developed method.

According to the results, thyme and rosemary oils exhibited the highest antimicrobial effectiveness against the tested pathogens. The composition of culture medium affected the biofilm features and the antibacterial activity of the analyzed compounds. The susceptibility of planktonic cells to EOs was lower in the wound medium than in the standard culture medium, while biofilm tolerance varied. The developed research methodology allows for the assessment of the antibiofilm properties of volatile substances.

The standardization of the *in vitro* methodology, especially evaluating the volatiles, is required to assess the factual EOs antimicrobial activity. Moreover, the applied models should reflect the infection environment.