



**DOKAZOVANJE ANTIMIKOTIČNEGA  
DELOVANJA VODNIH EKSTRAKTOV NA  
KVASOVKO *Candida albicans***

**RAZISKOVALNA NALOGA**  
**Področje: Druga področja- biotehnologija**

Avtor: Lara MARKELJ, Neža PERKO, Maša REPINC, 4. L

Program: Strokovna gimnazija

Mentor: mag. Marjetka KASTELIC ŠVAB

Strahinj, april 2020

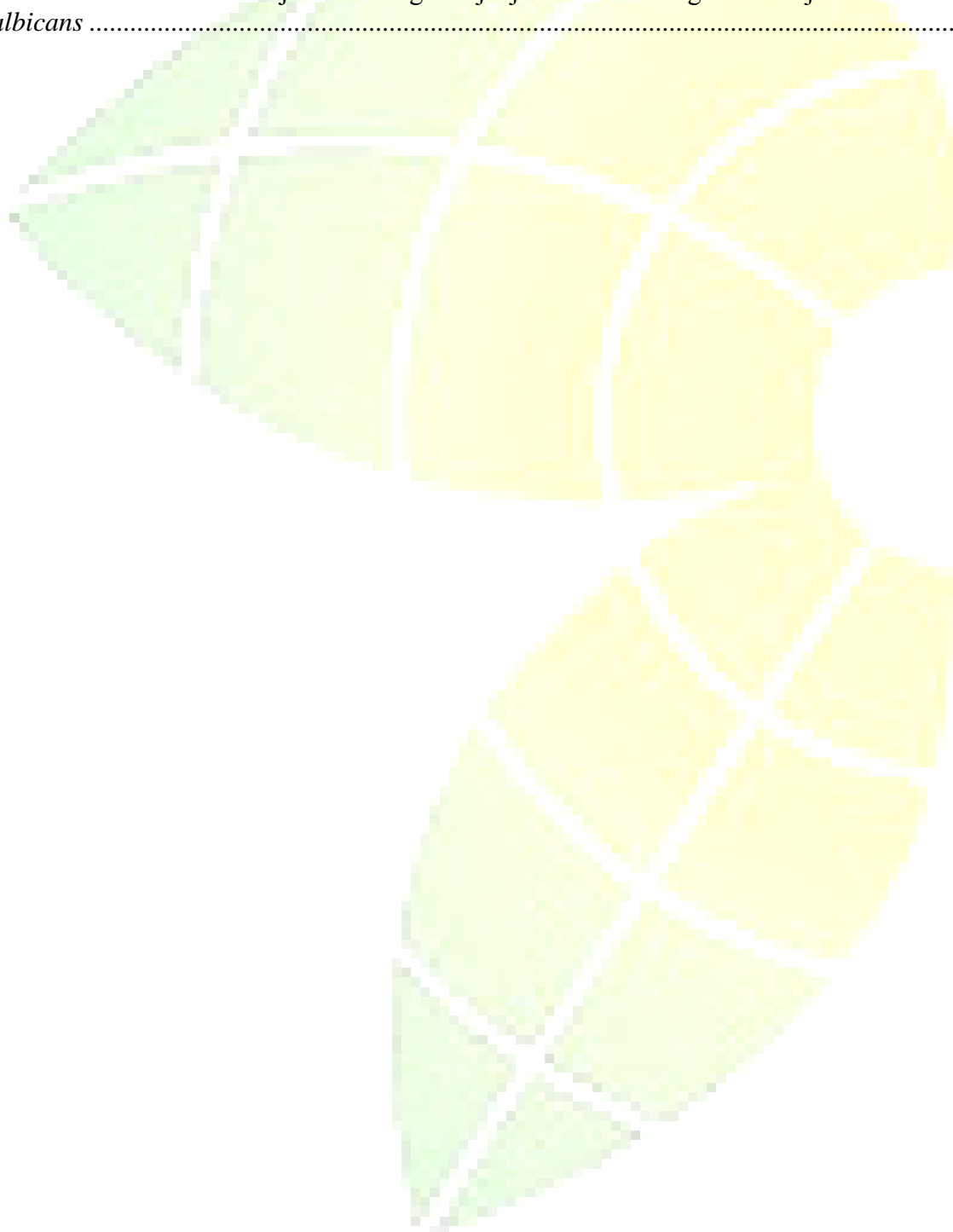
## I KAZALO

1	Vsebina	
	I KAZALO .....	I
	Povzetek .....	1
	Abstract .....	2
	Zahvala .....	3
1	UVOD .....	4
1.1	DELOVNE HIPOTEZE .....	6
2	TEORETIČNI DEL .....	8
2.1	GLIVE .....	8
2.2	<i>Candida spp.</i> .....	8
2.3	<i>Candida albicans</i> .....	9
2.4	KANDIDOZE .....	10
2.5	SPODBUJEVALCI RASTI KVASOVK <i>Candida albicans</i> .....	12
2.5.1	MLEKO .....	12
2.5.2	KAVA .....	13
2.6	NARAVNI ANTIMIKOTIKI .....	13
2.6.1	PROPOLIS .....	13
2.6.2	ZELENI ČAJ .....	14
2.6.3	SEMENA GRENIVKE .....	15
2.7	DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM .....	16
2.8	MIKROSKOPIRANJE .....	16
3	EKSPERIMENTALNI DEL .....	17
3.1	PRIPRAVA GOJIŠČ .....	17
3.1.1	SABOURAUD- 4 % MALTOSE AGAR .....	17
3.1.2	YGC Agar .....	18
3.1.3	Krvni agar PDA .....	20
3.1.4	Brain Heart Broth agar .....	22
3.2	IZOLACIJA ČISTE KULTURE .....	22
3.3	IDENTIFIKACIJA <i>C. albicans</i> .....	26
3.3.1	KATALAZNI TEST .....	26
3.3.2	ENOSTAVNO BARVANJE .....	27
3.4	DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM .....	28
3.4.1	PRIPRAVA PERKOLATOV .....	28

3.4.2	PRIPRAVA ANTIMIKOTIČNIH DISKOV .....	31
3.4.3	IZVEDBA DIFUZIJSKEGA ANTIBIOGRAMA .....	32
4	REZULTATI.....	34
4.1	REZULTATI PO PRVI NACEPITVI , INKUBACIJI in KATALAZNEM TESTU 34	
4.2	PO DRUGI NACEPITVI IN INKUBACIJI.....	39
4.3	REZULTATI DIFUZIJSKEGA ANTIBIOGRAMA .....	40
5	RAZPRAVA .....	44
6	ZAKLJUČEK.....	46
7	VIRI IN LITERATURA .....	<b>Napaka! Zaznamek ni definiran.</b>

## II KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Rezultati kultivacije kvasovk brisa ustne sluznice osebe 1 .....	34
Tabela 2: Rezultati kultivacije kvasovk brisa ustne sluznice osebe 2.....	35
Tabela 3: Rezultati kultivacije kvasovk brisa ustne sluznice osebe 3.....	35
Tabela 4: Rezultati kultivacije kvasovk brisa ustne sluznice osebe 4.....	36
Tabela 5: Rezultat inhibicijskih con- ugotavljanje antimikotičnega delovanja na kvasovko <i>C. albicans</i> .....	41



### III KAZALO GRAFIKONOV

Figure 1: prikaz porasti na Sabouraud maltose agarju .....	37
Figure 2: prikaz porasti na YGC agarju .....	37
Figure 3: prikaz porasti na krvnem agarju .....	38
Figure 4: prikaz porasti v brain-heart broth agarju .....	38
Figure 5: premeri inhibicijskih con različnih vodnih ekstraktov v mm .....	41



#### IV KAZALO SLIK

Slika 1: Germ tube test .....	10
Slika 2: Difuzijski antibiogram .....	16
Slika 3: Tehtanje gojišč (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	18
Slika 4: Priprava gojišča z magnetnim mešalom (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	19
Slika 5: Krvni agar in defibrinirana ovčja kri (vir: lastni).....	21
Slika 6: Dodajanje krvi gojišču (vir: lastni) .....	21
Slika 7: Odvzeti vzorci brisa ustne sluznice (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	23
Slika 8: Utekočinjanje gojišča (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	24
Slika 9: Prelita gojišča (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	24
Slika 10: Aseptično prenašanje kultur (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	25
Slika 11: Penjenje kulture pri katalaznem testu (Vir fotografije: osebni arhiv).....	26
Slika 12: Priprava perkolata zelenega čaja (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	28
Slika 13: Perkolat zelenega čaja (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	29
Slika 14: Trenje grenivkinih pešk (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	30
Slika 15: Perkolator (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	31
Slika 16: mikrofiltriranje perkolatov (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	31
Slika 17: Namakanje sterilnih diskov v propolisu (Vir fotografije: osebni arhiv).....	32
Slika 18: Gojišče (5% krvni PDA agar s kloramfenikolom) s kultivacijo <i>C. albicans</i> (Vir fotografije: osebni arhiv).....	39
Slika 19: Kandida pod 400x povečavo (Vir fotografije: osebni arhiv) .....	40

## Povzetek

*Candida albicans* (*C. albicans*) je gliva kvasovka, ki pri človeku povzroča mikoze oziroma glivične okužbe. *C. albicans* je del naše naravne mikrobiote, nahaja se v ustni votlini, sluznicah trebušne votline in spolovil, vendar vpliv različnih dejavnikov, največkrat padec odpornosti, lahko poruši ravnovesje v našem telesu in število teh oportunističnih gliv naraste. Tako lahko postanejo zajedavske in praviloma še bolj oslabijo naš imunski sistem in lahko napadejo tudi respiratorne organe.

Glavni namen raziskovalne naloge je sestaviti čim ugodnejše gojišče za uspešno kultivacijo *C. albicans* in s pomočjo difuzijskega antibiograma odkriti različne antimikotične učinkovine, ki naj bi zaviralno delovale na rast glive *C. albicans*.

Praktični del smo pričeli s pridobivanjem brisov sluznic ustnih votlin oseb, ki naj bi trpele za kandidozo. Vzorce smo nato prenašali na različno pripravljena sestavljena gojišča, kajti poleg izoliranja čiste kulture, so nas zanimali tudi vplivi različnih gojišč in različnih spodbujevalcev rasti (kave in mleka) na uspešnejšo razrast *C. albicans*. Opravili smo tudi pregled morfoloških značilnosti kolonij *C. albicans* in identifikacijo le te s pomočjo klaisčnih identifikacijskih morfoloških in biokemijskih metod (katalazni test, enostavno barvanje z metilenskim modrilom in mikroskopiranje). Z metodo difuzijskega antibiograma smo ugotavljali antimikotično delovanje treh potencialnih učinkovin, ki naj bi zavirale rast kandidate, perkolata grenivkinih pešk, perkolata zelenega čaja ter ekstrakta domačega propolisa. Dilucijski antibiogram smo izvajali na PDA gojišču z dodatkom krvi in antibiotika. Ugotovili smo, da perkolat zelenega čaja ni zaviral rast kandidate. Zaviralen učinek je bil prisoten pri ekstraktu grenivkinih pešk, največji pa pri propolisu, pri katerem so bile inhibicijske cone največje.

Ključne besede: kandidoza, *Candida albicans*, naravni antimikotiki, izolacija *C. albicans*, identifikacija *C. albicans*, difuzijski antibiogram, perkolacija

## Abstract

*Candida albicans* (*C. albicans*) is a yeast fungus that causes mycosis or fungal infections in humans. *C. albicans* is a part of our natural microbiota, it is found in the oral cavity, mucous membranes of the abdomen and genitals, but the influence of various factors, most often a weakened immune system, can break the balance in our body and the number of these opportunistic fungi increases. As a result, they can become parasitic and, as a rule, further weaken our immune systems and can attack the respiratory organs as well.

The main purpose of this research paper is to construct the most appropriate medium for the successful cultivation of *C. albicans* and to identify, through a diffusion antibiogram, various antifungal substances, which are supposed to have an inhibitory effect on *C. albicans*.

The practical part started with taking oral mucous swabs of people who are supposed to suffer from candidiasis. The samples were then transferred to differently prepared composed media, because apart from isolating the pure culture, we were also interested in the effects of different media and different growth stimulator (coffee and milk) on the more successful growth of our culture. We also examined the morphological characteristics of *C. albicans* colonies and identified them by using biochemical identification methods (a catalase assay, simple staining with methylene blue and microscopy). The method of diffusion antibiogram was used to determine the antifungal activity of three potential substances that are expected to inhibit the growth of candida: perchlorate of grapefruit seed, perchlorate of green tea and the concoction of homemade propolis. Diffusion antibiogram was performed on PDA medium supplemented with blood and antibiotic. We have found out that green tea percolate did not inhibit candida growth. The inhibitory effect was present in grapefruit pawn extract and the greatest in propolis, where the inhibition zones were the highest.

**Key words:** candidiasis, *Candida albicans*, natural antifungal substances, identifications of *C. albicans*, isolation of *C. albicans*, diffusion antibiogram, percolate



## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujemo naši mentorici, mag. Marjetki Kastelic Švab, ki nam je pomagala najti rešitev za vsako težavo in odgovor na vsako vprašanje ter za potrpljenje, potrebno pri izdelavi te raziskovalne naloge.

Posebna zahvala pa gre tudi laborantkama, Ivani Grošelj in Maši Škrlep, za pomoč pri pripravi vsega potrebnega materiala, s čimer sta nam kar se da olajšali nalogo.

Hvala tudi Hani Čosić za pomoč pri angleških prevodih.

## 1 UVOD

*Candida albicans* (*C. albicans*) je gliva iz rodu *Candida*. Je dimorfna gliva (lahko raste kot kvasovka ali kot plesen), vendar v optimalnih pogojih prisotna v obliki kvasovke. Spada med oportunistične glive, ki lahko pri človeku povzročajo glivične okužbe imenovane kandidoze. *C. albicans* je sicer del naše naravne mikrobiote, nahaja se v ustni votlini, sluznicah trebušne votline in spolovil, vendar vpliv različnih dejavnikov, največkrat padec odpornosti, lahko poruši ravnovesje v našem telesu in število teh oportunističnih gliv naraste. Spremembe v normalni flori ali pa zmanjšanje odpornosti organizma omogočajo glivam, da se nenormalno razmnožujejo ali celo hematogeno širijo. Tako lahko postanejo zajedavske in praviloma še bolj oslabijo naš imunski sistem (Bergant Aleksandra, 2002: 1).

Glavni namen naše raziskovalne naloge je ugotoviti najbolj ugodno gojišče za uspešno izolacijo in dokazovanje *C. albicans* in s pomočjo difuzijskega antibiograma preizkusiti različne antimikotične učinkovine, ki naj bi potencialno delovale na glivo *C. albicans*.

V teoretičnem delu smo predstavili splošne značilnosti gliv rodu *Candida*, opisali značilnosti glive *C. albicans* ter kandidoz, ki jih povzročajo. Prav tako smo predstavili mleko in kavo kot ugodni hranili za *C. albicans* ter potencialne naravne antimikotike kot so propolis, zeleni čaj ter grenivkine peške. Predstavili smo tudi metode identifikacije biokultur in metodo difuzijskega antibiograma ter mikroskopiranja.

Praktični del smo pričeli z brisom ustne votline štirih različnih oseb, ki naj bi imele težave s kandidozo. Vzorce brisov smo prenesli sprva na štiri različno sestavljena kompleksna gojišča. Zanimali so nas tudi vplivi različnih sestav gojišč in različnih spodbujevalcev rasti (kave in mleka) na samo kultivacijo *C. albicans*. Opravili smo tudi pregled morfoloških značilnosti kolonij *C. albicans* in identifikacijo le te s pomočjo identifikacijskih biokemijskih metod (katalazni test, enostavno barvanje z metilenskim modrilom in mikroskopiranje).

Z metodo difuzijskega antibiograma smo ugotavljali antimikotično delovanje vodnega ekstrakta grenivkinih pešk in zelenega čaja ter vodnega pripravka suspenzije propolisa.

Difuzijski antibiogram smo izvajali na izbranem kompleksnem obogatenem gojišču PDA z dodatkom krvi in antibiotikom kloramfenikolom.

*C. albicans* predstavlja skupaj s še nekaterimi mikroorganizmi (koagulazno negativni stafilokoki, korinebakterije, propionibakterije itd.) normalno mikrobno populacijo tudi na koži. Vendar njeno prekomerno razrast nadzirajo metaboliti ostalih mikroorganizmov kožne mikroflore. Pri presnovi sestavljenih maščob, ki jih razkrajajo encimi gram pozitivnih bakterij, nastajajo nenasičene maščobne kisline, kot je oleinska kislina, ki ima močan protimikrobni učinek na gram negativne bakterije in nekatere glive. Te maščobe imajo tudi zelo neprijeten vonj. Deodoranti vsebujejo protibakterijske snovi proti gram pozitivnim bakterijam in s tem preprečujejo tvorbo nenasičenih maščobnih kislin (Orožen Adamič in Serbec, 2005: 275).

Nedavne ocene Nacionalnega inštituta za zdravje kažejo, da so patogeni biofilmi neposredno ali posredno odgovorni za več kot 80 % vseh mikrobnih okužb. *C. albicans* lahko kolonizira površino sluznice, na primer tiste, ki prekrivajo ustni in vaginalni epitelij in vstavljene medicinske pripomočke kot so protetika, srčne zaklopke in katetri. *C. albicans* je član zdrave človeške mikrobiote, ki asimptomatsko kolonizira več niš v telesu, vključno z gastrointestinalnim traktom, ženskim reproduktivnim traktom, ustno votlino in kožo. Pri večini posameznikov z zdravim imunskim sistemom je *C. albicans* neškodljiva in obstaja v sozvočju z drugimi člani mikrobiote. Vendar lahko motnje tega občutljivega ravnovesja, ki so na primer posledica sprememb v lokalnem okolju (pH premiki ali prehranske spremembe), uporabe antibiotikov ali sprememb imunskega sistema, ki jih povzroči okužba ali imunosupresivno zdravljenje, lahko omogočijo *C. albicans*, da se hitro razmnožuje in povzroči okužbo. Te okužbe kvasovk segajo od površinskih okužb sluznice in kože, izpuščajev in vaginalne. 75 % žensk ima vsaj enkrat v življenju kandidozo nožnice. Resnejše hematogene okužbe z glivo imajo precejšnjo stopnjo smrtnosti (v nekaterih primerih doseže 47 %) (Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4860025/>>, dostop: 28. 3. 2020).

*C. albicans* je tudi vzrok za bolnišnične okužbe, saj predstavlja 15 % vseh primerov sepse in povzroča v kliničnih okoljih 40 % okužb krvnega obtoka. Tako se z *C. albicans* lahko okužijo

tako imunokompetentne, kot imuno oslabiljene osebe. Te okužbe so še posebej resne v zadnji skupini, ki vključuje bolnike z AIDS-om, bolnike, ki se zdravijo s kemoterapijo zaradi raka ali imunosupresijsko terapijo, in posameznike z vsadnimi medicinskimi pripomočki (*Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4860025/>>, dostop: 28. 3. 2020).

Kot navaja Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, je priporočljivo za večjo občutljivost testa in zgodnejšo diagnostiko invazivne kandidaze hkratno testiranje na mananski antigen kandidate in protitelesa proti mananu. Celična stena gliv vsebuje skoraj vedno hitin skupaj še z drugimi glukani npr. manani, to so  $\beta$ -glukani, ki so značilni tudi za kvasovke *Candida spp.* Take teste v Sloveniji izvajajo v Laboratoriju za humoralno imunologijo. Test je validiran za kri brez antikoagulant in vensko kri s citratom, heparinom ali EDTA. Test izvajajo tudi v bronhoalveolarnem izpirku, likvorju, urinu ali aspiratu trahej. Pri odvzemu vzorca aspirirajo vsebino iz spodnjih dihal pri intubiranem bolniku. Specifičnost testa na mananski antigen kandidate je 97,5- 98,5 %, občutljivost je 61,9- 76,2 %. Skupaj s testom na protitelesa proti mananskemu antigenu je občutljivost 71,4- 90,5% ([http://www.imi.si/diagnosticna-dejavnost/preiskave/preiskava\\_11074](http://www.imi.si/diagnosticna-dejavnost/preiskave/preiskava_11074), 19.3.2020).

## 1.1 DELOVNE HIPOTEZE

Z raziskovalno nalogo smo postavili naslednje hipoteze:

- Na osnovi znanstvenih dejstev, da je kvasovka *C. albicans* del normalne mikrobiote, domnevamo, da vzorce kandidate lahko pridobimo z brisom iz ustne votline.
- Domnevamo, da bosta kava in mleko kot dodatek gojišču omogočila boljšo rast kvasovke *C. albicans*, saj sta omenjeni živili v literaturi pri bolnikih s kandidozo največkrat odsvetovani.

- Domnevamo, da bo krvni agar in krvni agar z dodatkom mleka in kave, po sestavi najprimernejše gojišče za uspešno izolacijo in nadaljno kultivacijo *C. albicans*, zaradi podobnih pogojev rasti njenemu naravnemu življenjskemu okolju.
- Domnevamo, da bomo kvasovko *C. albicans* lahko identificirali na podlagi enostavnega barvanja z metilenskim modrilom ter mikroskopiranja in ugotavljanja aktivnosti encima katalaze.
- Menimo, da bodo perkolat grenivkinih pešk, perkolat zelenega čaja in vodna suspenzija propolisa na rast kvasovke *C. albicans* učinkovali zaviralno.

## 2 TEORETIČNI DEL

### 2.1 GLIVE

Na Zemlji je več kot milijon različnih vrst gliv, vendar jih je med njimi manj kot 200 takih, ki povzročajo človeške bolezni. Za take okužbe so bolj dovzetne imunsko oslABLJENE osebe, zelo malo gliv je tako virulentnih, da bi povzročile bolezen pri sicer zdravih ljudeh (Gubina, Ihan, 2002: 457).

Glive so evkarionski organizmi, ki jih uvrščamo v samostojno kraljestvo in sicer v kraljestvo gliv. So heterotrofi, v naravi se pojavljajo kot saprofiti, paraziti ali komenzali. Po obliki rasti ločimo kvasovke, plesni in dimorfne glive. Kvasovke so okrogle in ovalne enocelične glive, ki se razmnožujejo z brstenjem. Vzbrstele celice imenujemo blastospore, če pa le te ostanejo v stiku s starševsko celico in se ne ločijo od nje, nastane struktura nanizanih celic, ki spominjajo na hifo in se imenuje psevdohifa ali psevdomicelij. Primer take kvasovke je gliva *C. albicans* (Gubina, Ihan, 2002: 457).

### 2.2 *Candida spp.*

Glive rodu *Candida spp.* so ubikvitarne kvasovke, obstaja jih približno 200 različnih vrst znotraj rodu. Po navadi se večina kvasovk rodu *Candida* nahaja v okolju, le nekaj vrst pa je del normalne mikrobne flore človeškega telesa. Pogoste oportunistične glive pri človeku so iz rodu *Candida spp* (Gubina, Ihan, 2002: 482).

Najpogostejša in najpomembnejša gliva iz rodu *Candida* je *Candida albicans* (povzroča približno 54 % okužb), poleg nje pa iz kliničnih vzorcev pogosteje izoliramo še glive *C. glabrata* (11 %), *C. tropicalis* (16 %), *C. krusei* (6 %) in *C. parapsilosis* (11%) (Sistemske glivične okužbe < <http://www.medenosrce.net/predmeti/infekcijske-bolezni/82-literatura/1176-sistemske-glivicne-okuzbe>> dostop: 20. 3. 2020).

Pomembno je, da natančno določimo povzročitelja mikoze, saj so nekatere glive iz rodu *Candida* odporne na določene antimikotike in nam podatek o vrsti pomaga pri odločanju za terapijo. Odpornost gliv na antimikotike preizkušamo s posebnimi E-testi (Bergant, 2002: 4).

### **2.3 *Candida albicans***

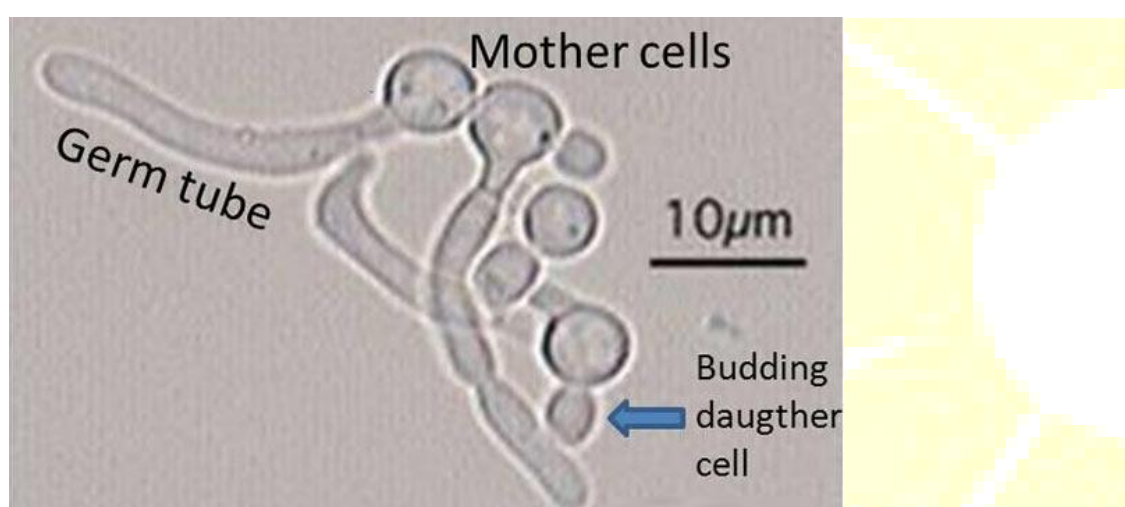
*C. albicans* je enocelična, majhna, ovalna diploidna dimorfna gliva, velikosti premera celice 4-7  $\mu\text{m}$ . Lahko se pojavi v obliki kvasovk (v optimalnih pogojih) ali kot plesen. Razmnožuje se vegetativno z brstenjem, brsti se podaljšujejo v podaljške (pseudohife), ki se na koncu cepijo v samostojne celice imenovane blastospore (Gubina, Ihan, 2002: stran 482).

V telesu je gliva del normalne mikroflore kože, sluznic ustne votline, žrela in prebavnih poti. Do naselitve z njimi pride že ob rojstvu ali kmalu po njem. *C. albicans* lahko zraste v obliki klamidiospor (večje celice obdane z debelejšo celično steno), pseudohif ali blastospor. *C. albicans* je po Gramu pozitivna gliva in vsebuje encim katalazo. V obeh oblikah (plesen, kvasovke) je po Gramu pozitivna. Gliva *C. albicans* lahko tvori biofilme (Gubina, Ihan, 2002: stran 482).

Germ Tube test je presejalni test, ki se uporablja za razlikovanje *C. albicans* od drugih kvasovk. O nastanku zarodnih cevi (Germ tubes) sta prva poročala Reynolds in Braude, in sicer leta 1956. Ko *Candido* 3 ure gojimo v človeškem ali ovčjem serumu pri 37 °C, se tvorijo zarodne cevi, ki jih z mokrimi KOH (kalijev lug) filmi lahko zaznamo kot nitaste izrastke, ki segajo od celic kvasovk. Pri inkubaciji v beljakovinskem mediju pri približno 95–97% izoliranih *C. albicans* razvije zarodne cevi. Nastajanje zarodnih cevi je povezano s povečano sintezo beljakovin in ribonukleinske kisline. Raztopine Germ Tube vsebujejo bistvena hranila za sintezo beljakovin. Zarodna cev je eden od virulenčnih dejavnikov *Candida albicans*. To je hiter test domnevne identifikacije *C. albicans* (Germ Tube Test- Principle, Procedure, Results, Interpretation and Limitations <<https://microbiologyinfo.com/germ-tube-test-principle-procedure-results-interpretation-and-limitations/>>, dostop: 29. 3. 2020).



Postopek izvedemo tako, da damo v majhno epruveto 0,5 ml ovčjega, govejega ali človeškega seruma. S pipeto prenesemo majhno kolonijo kvasovk v serum. Epruveto inkubiramo 2 do 4 ure pri 37 °C. Po inkubaciji kapljico seruma prenesemo na objektno steklo, pokrijemo in pogledamo pod mikroskopom. Če je identifikacijski test pozitiven, lahko opazimo kratek nitasti podaljšek, ki izhaja iz celice kvasovk, bočno na mestu nastanka (Slika 1). Zarodna cev je približno tri do štirikrat večja od dolžine celice kvasovk. (Germ Tube Test- Principle, Procedure, Results, Interpretation and Limitations <<https://microbiologyinfo.com/germ-tube-test-principle-procedure-results-interpretation-and-limitations/>>, dostop: 29. 3. 2020)



**Slika 1: Germ tube test**

(Vir fotografije: Germ Tube Test- Principle, Procedure, Results, Interpretation and Limitations <<https://microbiologyinfo.com/wp-content/uploads/2015/06/Germ-Tube-Test-Principle-Procedure-Results-Interpretation-and-Limitations.jpg>>, dostop: 28. 3. 2020)

## 2.4 KANDIDOZE

Glive lahko škodljivo vplivajo na človeka. En način škodljivega vpliva je okužba. Kadar govorimo o glivičnih okužbah govorimo o mikoza. Da pa mikoze sploh nastanejo, mora gliva najprej vstopiti v telo iz okolja ali pa so že del normalne mikrobne flore človeškega telesa. Vstopa lahko preko kože, dihal ali preko sečil, prebavil in spolovil. Kadar se obrambna sposobnost sluznice sečil in spolovil spremeni, se lahko glive, ki so sicer del normalne flore teh predelov prekomerno razrastejo in prehajajo tudi v ostale organe (Gubina, Ihan, 2002: stran 482).



*C. albicans* je najpogostejša povzročiteljica oportunističnih glivičnih okužb iz rodu *Candida spp.* Take okužbe imenujemo kandidoze (Orožen Adamič, Sernec, 2017: stran 246).

Vzročne okoliščine povezane s kandidozo so vlažno okolje, sprememba epitelija (zaradi poškodb, opeklin, odrgnin), spremembe v lokalni bakterijski flori (posledica jemanja antibiotikov), fiziološka stanja, bolj dojemljiva skupina ljudi za tovrstne okužbe (nedonošenčki, majhni otroci, starostniki, nosečnice), defekti limfocitov T, endokrine bolezni, zloraba drog ter bolniki s katetri in vsadki (Bergant, 2002: 3).

Okužbe, ki jih povzročajo glive iz rodu *Candida*, lahko razdelimo v tri skupine:

#### **Površinske kandidoze:**

- **SOR:** Okužba sluznic je najpogostejša oblika povrhnje kandidoze. Na sluznicah vidimo majhne bele pege, ki se med seboj zlivajo in tvorijo psevdomembrane. Pogosto okužbo najdemo v ustih pri dojenčkih, pod protezo, pri bolnikih z AIDS-om (Orožen, Sernec, 2017: stran 246 in Gubina, Ihan, 2002: stran 483).
- **VAGINALNA KANDIDOZA:** To okužbo ima vsaj enkrat v življenju 75% žensk. Najpogosteje se pojavi v času nosečnosti. Znaki okužbe se kažejo kot bele pege na epiteliju vulve, vagine in cerviksa, ki jih spremlja srbenje, bolečina in nenormalen nožnični izcedek (Bergant, 2002: stran 2).
- **KANDIDOZA PENISA:** Gre za poškodbe kože predvsem na lanu, spremlja jih srbenje. Moški se s kandidozo lahko okužijo preko spolnih stikov z okuženimi ženskami (Bergant, 2002: stran 2).
- **»DERMATITIS POD PLENICAMI«:** Okužba je prisotna pri majhnih otrocih. Koža je pordela, površina je hrapava, v okolici pa je vidno drobno luščenje (Gubina, Ihan, 2002: stran 483).
- **KOŽNA KANDIDOZA:** Pojavlja se na predelih, kjer je koža vlažna, kar omogoča glivi dobro razrast. Kandida se po navadi prekomerno razmnoži pod prsmi, pazduho in med prsti (Orožen, Sernec, 2017: stran 246).
- **OKUŽBE NOHTOV – ONIHOMIKOZE:** Okužbe nohtov so pogoste pri gospodinjah, pri ljudeh, ki imajo roke veliko v vodi – pomivalke, pri

strežnicah, športnikih itd. Koža ob nohtu oteče, je boleča in živo rdeče barve. Noht postane rumenkast, hrapav in zadebeljen (Gubina, Ihan, 2002: stran 484).

### **Kronična mukokutana kandidoza**

- Glive iz rodu *Candida spp* lahko redko povzročajo kronično mukokutano kandidozo. Ta prizadene kateri koli del kože in sluznice. Bolezen se začne že v otroštvu in z vmesnimi obdobji traja celo življenje. Na okuženih predelih se pojavijo bradavičaste, brazgotinaste spremembe. Prizadete osebe imajo pogosto nepravilnosti v celično posredovanem imunskem odzivu (Gubina, Ihan, 2002: stran 484).

### **Sistemska okužba s kandido**

- Sistemska kandidoza je lahko omejena na organ ali organski sistem, lahko pa se razvije razširjena oblika bolezni. Klinični potek okužbe je odvisen od različnih lastnosti mikroorganizma, najbolj pa od gostiteljevega imunskega odziva. Do kandidemije (vdor kandid v krvni obtok) lahko pride ob poškodbi sluznic ali kože, okužbi žilnih katetrov in kirurških posegov. Pri bolnikih lahko kandidemija izzveni spontano, ali pa po odstranitvi okuženih katetrov. Pri imunsko oslabljenih bolniki se lahko razvije razširjena (diseminirana) glivična okužba, le ta pa največkrat prizadene jetra, ledvice, vranico in osrednji živčni sistem. Vse sistemske kandidoze so za bolnika smrtno nevarne, namreč smrtnost sega do kar 60 % (Gubina, Ihan, 2002: stran 484).

## **2.5 SPODBUJEVALCI RASTI KVASOVK *Candida albicans***

### **MLEKO**

Mleko je prvo hranilo, s katerim smo se srečali že v otroštvu in nas spremlja celo življenje. Za naše telo je tako rekoč “popolno živilo”, saj je bogat vir beljakovin, mineralov in vitaminov, ki jih naše telo nujno potrebuje. Vsebnost sestavin v kravjem mleku je sledeče: voda (86–89%), maščobe (3,2- 5,5 %), skupne beljakovine (2,6- 4,2 %), kazein (2,8 %), serumske beljakovine (0,7 %), minerali (0,6- 0,8 %) in pa enostavni sladkor laktoza (2-8 %). (Dobro v mleku <<https://www.l-m.si/o-mleku/dobro-v-mleku/>>, dostop: 10. 3. 2020).

Pri kandidi je pomembno, da se hrana v telesu ne zadržuje preveč, saj s tem onemogočamo, da bi postala leglo za patogene bakterije. Zato pri oslabei presnovi pomaga ločevanje med beljakovinami in škrobom, ki se skupaj stežka presnavljajo in upočasnjujejo celoten proces prebave (Lončar, 2007: stran 81, 82). Uživanje mleka torej spodbuja rast kvasovk *C. albicans*, saj je težko prebavljivo zaradi mlečnega sladkorja, ki ga večina odraslih ne more prebaviti, saj s starostjo počasi prenehamo izdelovati encim laktaza, ta pa pripomore k razrasti kvasovke. Mlečni sladkor predstavlja kvasovki *C. albicans* vir hrane in je zaradi njega njena rast pospešena. Zato se je mleku in mlečnim izdelkom pri obolenju kandidoze priporočeno izogibati, slednje pa ne velja za jogurt. V jogurtu najdemo probiotične bakterije, ki ugodno delujejo na delovanje našega črevesja, pravzaprav onemogočajo rast drugim, pogosto patogenim mikroorganizmom in oportunističnim mikroorganizmom.

## **KAVA**

Kava je tako rekoč tradicionalna poživilna pijača. Poleg raznih arom in vitaminov vsebuje enega izmed najpomembnejših rastlinskih alkaloidov – kofein, ki spodbuja in uravnava delovanje osrednjega živčevja. Kofein je tudi diuretik, spodbuja izločanje vode iz telesa in pospešuje prebavo, kar je lahko tudi posledica porušene mikroflore našega črevesja. Rastline proizvajajo kofein, ker jih ta kot naravni pesticid varuje pred žuželkami, vendar pa lahko ugodno deluje na rast gliv in nekaterih drugih organizmov. Pitje kave je zato pri bolezenskem stanju kandidoze odsvetovano.

## **2.6 NARAVNI ANTIMIKOTIKI**

### **PROPOLIS**

Propolis ali zadelavina je smolast čebelji proizvod, katerega zdravilni učinki so bili cenjeni že pred našim štetjem. V naravi ga čebele uporabljajo kot snov, katere poglaviti namen je obramba panja. Čebele ga nanesejo na notranje stene panja, v zadelave razpok in špranj, za popravilo satja, za okrepitev tankih sten v satju ter za obdelavo vhoda v panj. Vse to pripomore k zaščiti zaroda pred vetrom, vlago in predvsem pred vdorom mikroorganizmov (Propolis, <<https://www.bodieko.si/propolis>> Dostop: 10. 3. 2020).

V osnovi je propolis sestavljen iz različnih rastlinskih smol, ki jih čebele naberejo na brezah in drugem drevju. Propolis sestavljajo smola, eterična olja, cvetni prah, vitamini (B1, B2, B6, C, E), minerali (magnezij, kalcij, kalij, natrij, baker, cink, mangan, železo) in druge organske snovi. V njem najdemo tudi številne aromatične organske kisline, kot so kofeinska kislina, cimetna kislina, fenolkarbonska kislina, antibiotične spojine in druge. (Propolis, <<https://www.bodieko.si/propolis>> Dostop: 10. 3. 2020)

Zadelavino ali propolis poberejo iz panja in ga pred uporabo še obdelamo s 60 do 70 % alkoholno raztopino. Propolis ugodno deluje na odpravljanje številnih težav, saj deluje antibakterijsko (bakteriocidno in bakteriostatično), antivirusno in antiglivično, kar je potrdila tudi raziskava Seasonal Effect on Brazilian Propolis on *Candida albicans* and *Candida Tropicalis*; J. M. Sforina et al/in drugih. Znano je tudi, da vsebuje široko paleto vitaminov in mineralov ter spodbuja delovanje imunskega sistema.

## **ZELENI ČAJ**

Zeleni čaj pridobivamo iz listov zimzelenega čajevca *Camellia sinensis*, ki izvira iz vzhodne Azije. V divjini lahko doseže velikost drevesa, pri gojenju pa ga zaradi lažjega obiranja listov obrezujejo tako, da njegova višina ne presega 1,5 m. Grm je bogato razvejan z usnjatimi in podolgovatimi listi. Mlajši listi so na videz sivkasti, saj je njihova spodnja stran porasla z drobnimi sivimi dlačicami, starejši listi so temno zeleni. Iz najmlajših, zgornjih še neodprtih listov pridobivamo čaj najboljše kakovosti (Zeleni čaj, <<https://www.gorenskelekarne.si/svetovanje-clanek/zeleni-caj>> dostop: 10. 3. 2020).

Zeleni čaj uporabljamo kot poživilo, saj vsebuje kofein, ki ga najdemo tudi v kavi. Ker je poživilo v listih čajevca vezano na čreslovine, se v prebavilih iz njih počasneje sprošča, zato učinek nastopi kasneje kot pri kavi, vendar traja dlje časa. Čreslovina deluje pomirjevalno na želodec in črevesje, saj skoraj povsem zaščiti sluznico, s čimer onemogoča okolje rasti za škodljive organizme. Znani so tudi drugi pozitivni učinki njegovega delovanja proti mikroorganizmom. Kakovosten čaj namreč vsebuje tudi veliko antioksidantov, pospešuje prebavo in blaži prebavne težave, kot je na primer driska. Vsebuje tudi grenčine, ki krepijo delovanje naših prebavnih žlez. Za kandidozo je še posebej pomembno dejstvo, da krepí

delovanje jeter in žolča. Pri prehrani s povečanim vnosom maščob in beljakovin in zato povečano potrebo po razstrupljanju je to še kako pomembno (Lončar, 2013: stran 93-95).

## **SEMENA GRENIVKE**

Grenivka zaradi svojega kislo-grenko-sladkega okusa ni najbolj priljubljen sadež iz skupine citrusov, čeprav ima na naše zdravje izjemno blagodejne učinke. Zaužitje le enega sadeža na dan naj bi bilo dovolj za pokritje dnevne potrebe odraslega človeka po C- vitaminu. Askorbinska kislina (vitamin C) je vodotopen vitamin, ki ima pomembno antioksidativno vlogo in sodeluje v številnih bioloških procesih ter pripomore k izboljšanju imunskega sistema (Previdno pri uživanju grenivk <<https://www.dnevnik.si/111824> > Dostop: 16. 3. 2020).

Grenivka vsebuje tudi snov pektin, ki pomaga pri zniževanju povišanega holesterola v krvi. Pri zdravljenju kandidoze uporabljamo izvleček pešk grenivke, pri tem pa moramo biti pozorni na to, da pripravek ne vsebuje sladkorjev ali sladil, saj le ti pospešujejo rast *C. albicans*. Izvleček je učinkovit tako pri notranji kot zunanji uporabi in poleg kandidate zatira tudi zajedalce (eno- in večcelične), viruse, bakterije in ostale glivice. Izvleček pešk grenivke naravno razstruplja telo, ojača imunski sistem ter poskrbi za alkalnost krvi.

Izvleček pešk grenivke deluje že v zelo majhnih koncentracijah, deluje kot antibiotik in protiglivično ter nima nezaželenih stranskih učinkov. Izvleček pešk grenivke je torej varna alternativa močnim antibiotikom (Vesel, 2007: str. 64- 65).

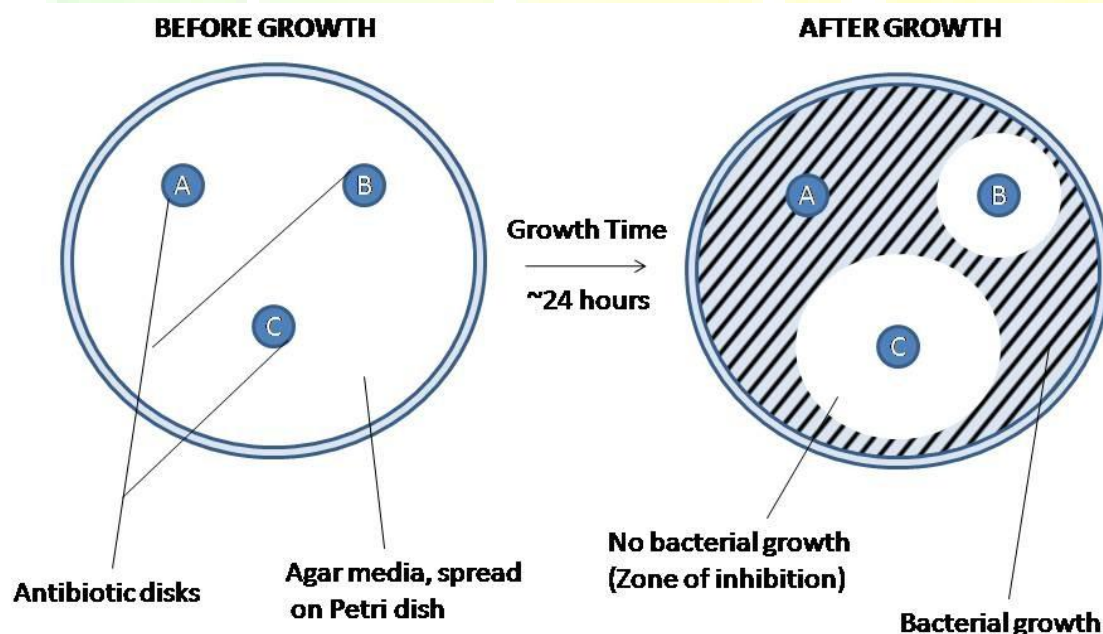
## **2.6 PERKOLACIJA- EKSTRAKCIJA TRDNO- TEKOČE**

Ekstrakcija je metoda, pri kateri iz zmesi izvlečemo eno od sestavin. Poznamo ekstrakcijo trdno – tekoče ali tekoče – tekoče. Perkolacija je ena izmed metod ekstrakcije trdno – tekoče, pri kateri je tekoča faza topilo (voda, alkohol, kislina), s katerim izperemo željeno sestavino tako, da topilo počasi prehaja skozi sloj biološkega materiala. Napravo za perkolacijo imenujemo perkolator, ekstrakt pa perkolat (Vrhovnik, 2012: str. 70).



## 2.7 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM

Difuzijski antibiogram je preprosta in hitra mikrobiološka metoda ugotavljanja občutljivosti mikrobov na protimikrobne učinkovine. Izvedemo ga tako, da na trdno gojišče naneseemo, z razmazom inokulum čiste kulture. Vzorec po površini dobro razmažemo, da dosežemo konfluentno razrast kulture. Še pred inkubacijo prenesemo diske prepojene s potencialnimi protimikrobnimi učinkovinami. Po končani inkubaciji rezultat difuzijskega antibiograma odčitamo tako, da izmerimo premer inhibicijskih con (s kulturo neporaslih območij na gojišču) pri posameznem disku (Slika 2).



Slika 2: Difuzijski antibiogram

(Vir fotografije: Wikipedija, prosta enciklopedija <[https://en.wikipedia.org/wiki/Disk\\_diffusion\\_test](https://en.wikipedia.org/wiki/Disk_diffusion_test)>, dostop: 29. 3. 2020)

## 2.8 MIKROSKOPIRANJE

Svetlobni mikroskop je laboratorijska naprava za opazovanje objektov, ki so premajhni, da bi jih videli s prostim očesom. Sestavljen je iz mehanskih in optičnih delov. Mehanski deli sestavljajo revolver, vir svetlobe, makrometrski vijak (uporabljamo ga le pri najmanjši povečavi) in mikrometrski mikroskopski vijak (uporabljamo za izostritev slike), tubus, mizica, noga, držalo in stojalo. Optični deli sestavljajo objektiv (zbira svetlobo in prikazuje

sliko), okular (sistem leč, ki sliko dodatno poveča) in kondenzor z zaslonko (poskrbi za enakomerno osvetlitev objekta). Mikroskop uporabljamo predvsem zaradi njegove osnovne funkcije, povečave objektov.

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo pripravili pet različnih gojišč. Za izolacijo *C. albicans* smo uporabili: Sabouraud – 4 % maltose agar, YGC Agar in PDA z dodatkom 5 % defibrinogenizirane ovčje krvi ter tako dobili obogateno gojišče in Brain Heart Broth agar. Vsa gojišča smo tudi obogatili z domnevnimi pospeševalci rasti: z mlekom in kavo v različnih koncentracijah, da bi si zagotovili potencialno večjo razrast. Brise štirih oseb, ki so sumile na okužbo z mikozo, smo odvzeli s sterilnimi palčkami za odvzem vzorcev. Z ugotovljenim uspešnim gojiščem – obogaten krvni PDA agar s kloramfenikolom, smo nadaljevali z gojenjem in izolacijo same kvasovke *C. albicans*. Identificirati smo jo z katalaznim testom, enostavnim barvanjem in mikroskopiranjem. To je predstavljajo osnovo za nadaljnje delo, izvedbo antibiograma. Ker smo želeli ugotoviti antimikotično delovanje naravnih učinkovin na *C. albicans*, smo pripravili tudi diske, za izvedbo difuzijskega antibiograma in vodne ekstrakte: perkolat zelenega čaja, perkolat grenivkinih semen ter suspenzijo propolisa.

#### 3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ

##### **SABOURAUD- 4 % MALTOSE AGAR**

Material:

- 500 mL destilirane vode
- 32,5 g Sabouraud- 4 % maltose agar gojišče
- magnetno mešalo
- sterilne petrijeve plošče
- mleko (Zelene Doline, trajno, 3.5 % m. m.)
- ekstrakt kave Kerinba
- erlenmajerice
- reagenčne steklenice

- avtomatske pipete
- gorilnik

Postopek dela:

Najprej smo pripravili in avtoklavirali gojišče Sabouraud- 4 % maltose agar in ga razdelili v sedem reagenčnih steklenic. V eni smo pustili samo gojišče brez dodatkov, v drugo smo aseptično dodali 5 % mleka, v tretjo 10 % mleka, v četrto 20 % mleka. Po enakem principu smo gojišča pripravili še s kavo.

Uporabili smo različne kombinacije koncentracij mleka in kave v gojiščih, saj nas je zanimalo, če ima posebej mleko in posebej kava, oba v različnih koncentracijah, kakšen viden vpliv na uspešnejšo razrast kulture. Na tej točki raziskovanja je bil namen usmerjen v iskanje najugodnejšega gojišča za kvasovko *C. albicans*, kajti dobro gojišče omogoča naprej uspešno izveden antibiogram. Gojišča smo aseptično prelivali v sterilne petrijevke.

## YGC Agar

YGC Agar je selektivno gojišče za izolacijo in štetje kvasovk in plesni. Selektivno gojišče je gojišče, ki zavira razrast vsem drugim mikrobom, razen zelenim kulturam.



Slika 3: Tehtanje gojišč (Vir fotografije: osebni arhiv)

Material:

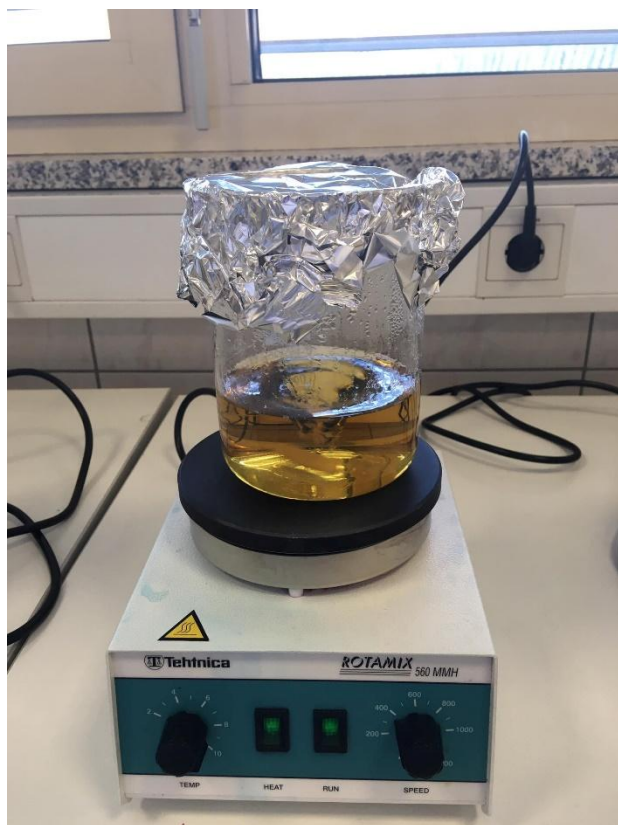
- 500 mL destilirane vode
- 20 g YGC Agar



- magnetno mešalo
- sterilne petrijeve plošče
- mleko (Zelene Doline, trajno, 3.5 % m. m.)
- ekstrakt kave Kerinba
- čaše
- reagenčne steklenice
- avtomatske pipete
- gorilnik

Postopek dela:

Najprej smo v čaši pripravili in avtoklavirali gojišče YGC Agar (Slika 4) in ga razdelili v tri reagenčne steklenice. V eni smo imeli gojišče YGC brez dodatkov, v drugi smo gojišču aseptično dodali 5 % mleka, v tretji pa smo gojišču dodali 5 % ekstrakta kave. Gojišča smo aseptično prelili v sterilne petrijevke.



Slika 4: Priprava gojišča z magnetnim mešalom (Vir fotografije: osebni arhiv )

## Krvni agar PDA

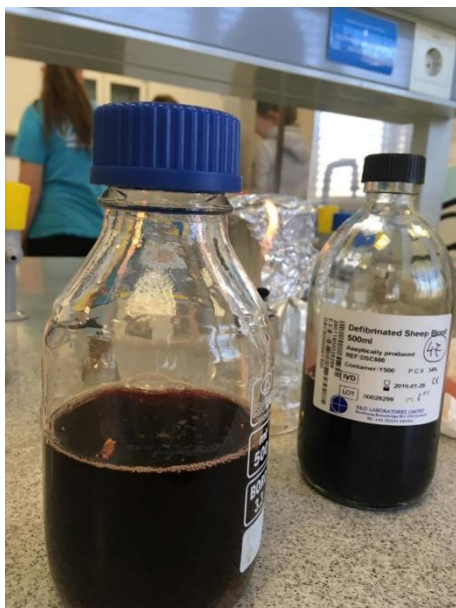
PDA gojišče z dodanim antibiotikom in dodatkom 5 % defibrinogenizirane ovčje krvi je obogateno gojišče, ki omogoča razrast glivam. Obogatena gojišča so osnovna gojišča, ki jim primešamo različne dodatke, da lažje izoliramo in gojimo zahtevnejše biokulture.

### Material:

- 500 ml PDA gojišče
- 0,05 g kloramfenikola (antibiotik)
- 25 ml defibrinogenizirane krvi
- magnetno mešalo
- sterilne petrijeve plošče
- mleko (Zelene Doline, trajno, 3.5 % m. m.)
- ekstrakt kave Kerinba
- reagenčne steklenice
- avtomatske pipete

### Postopek dela:

Najprej smo pripravili in avtoklavirali PDA gojišče, kateremu smo dodali 5 % defibrinogenizirane ovčje krvi (Slika 5,6). Kri smo aseptično dodali agarju, ohlajenemu na 40°C, saj bi pri toplejšem lahko prišlo do koagulacije beljakovin, sprememb hemoglobina v krvi. Gojišče smo razdelili v tri reagenčne steklenice. V eni smo pustili PDA gojišče brez dodatkov, v drugi smo gojišču dodali 5 % mleka, v tretji smo gojišču primešali 5 % ekstrakta kave. Gojišča smo aseptično prelili v sterilne petrijevke.



Slika 5: Krvni agar in defibrinirana ovčja kri (vir: lastni)



Slika 6: Dodajanje krvi gojišču (vir: lastni)

## **Brain Heart Broth agar**

Brain Heart Broth agar se uporablja za kultivacijo različnih patogenih mikroorganizmov.

Material:

- 18,5 g Brain Heart Broth agar
- 500 ml destilirane vode
- magnetno mešalo
- sterilne petrijeve plošče
- mleko (Zelene Doline, trajno, 3.5 % m. m.)
- kava Kerinba
- reagenčne posode
- avtomatske pipete

Postopek dela:

Najprej smo pripravili in sterilizirali Brain Heart Broth gojišče. Gojišče smo razdelili v tri reagenčne posode. V eni smo pustili osnovno gojišče, v drugo smo dodali 5 % mleka, v tretjo 5 % kave. Gojišča smo aseptično vlili v petrijevke.

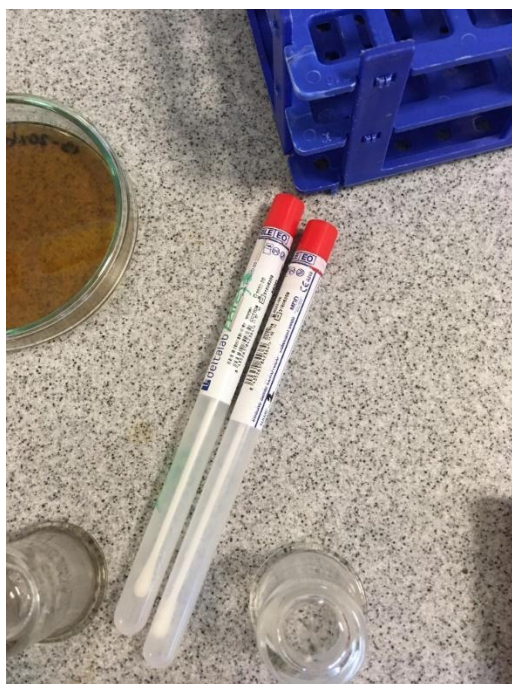
## **3.2 IZOLACIJA ČISTE KULTURE**

Material:

- 4 sterilne vatirane palčke za odvzem brisa sluznice ustne votline
- gorilnik
- stresalnik
- sterilne epruvete s fiziološko raztopino
- 52 petrijevk z gojišči
- eza

Postopek dela:

Štirim prostovoljkam smo posredovali sterilne vatirane palčke in navodilo za pravilen odvzem brisa vzorca sluznice ustne votline. Bris je potrebno opraviti zjutraj, še pred umivanjem zob in ga nato, dobro zaprtega, hraniti v hladilniku. Naslednji dan smo vsako palčko z vzorcem (Slika 7) pomočili v fiziološko raztopino, stresali in vzorec aseptično z ezo nacepili na gojišče z enojnim cikcakom. Za drugo, tretjo in četrto osebo smo (za vsako posebej) porabili 12 petrijev (Slika 9) (YGC agar, YGC agar + 5 % kave, YGC agar + 5 % mleka, krvni agar, krvni agar + 5 % kave, krvni agar + 5% mleka, Sabouraud agar, Sabouraud agar + 5 % kave, Sabouraud agar + 5% mleka, Brain heart broth, Brain heart broth + 5 % kave, Brain heart broth + 5 % mleka). Za prvo osebo pa 16 petrijev (YGC agar, YGC agar + 5 % kave, YGC agar + 5 % mleka, krvni agar, krvni agar + 5 % kave, krvni agar + 5% mleka, Sabouraud agar, Sabouraud agar + 5 % kave, Sabouraud agar + 10 % kave, Sabouraud agar + 20 % kave, Sabouraud agar + 5% mleka, Sabouraud agar + 10 % mleka, Sabouraud agar + 20 % mleka, Brain heart broth, Brain heart broth + 5 % kave, Brain heart broth + 5 % mleka). Vseh 52 petrijev z gojišči in nacepljenimi vzorci smo inkubirali 48 ur pri temperaturi 37 °C .



Slika 7: Odvzeti vzorci brisa ustne sluznice (Vir fotografije: osebni arhiv)

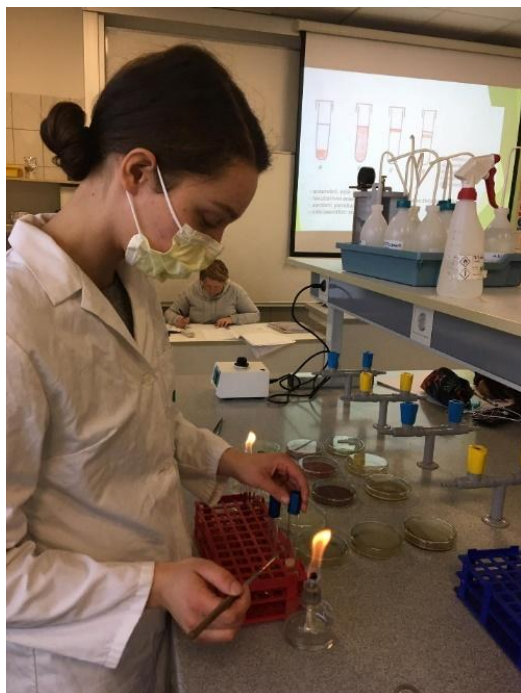




Slika 8: Utekočinjanje gojišča (Vir fotografije: osebni arhiv)



Slika 9: Prelita gojišča (Vir fotografije: osebni arhiv)



**Slika 10: Aseptično prenašanje kultur (Vir fotografije: osebni arhiv)**

Po inkubaciji smo izvedli katalazni test in zavrgli vse katalazno negativne kulture, ker smo želeli izolirati katalazno pozitivno *C. albicans*. Katalazno pozitivne kolonije smo prenesli na petrijevke z že izbranim selektivnim gojiščem za kandido (PDA agar + kloramfenikol + 5 % krvi), kjer so nam že prej uspešno rasle le katalazno pozitivne kolonije kvasovk ter jih inkubirali 2 dni pri temperaturi 37 °C .

Po končani inkubaciji je bilo porast kulture opaziti samo na dveh petrijevkah, katerih kolonije smo enostavno barvali ter mikroskopirali. Po znanih karakteristikah smo uspeli identificirati *C. albicans*. *C. albicans* nam je uspelo na koncu vzgojiti samo na eni od vseh teh petrijev in sicer na 5 % krvnem PDA agarju z dodanim kloramfenikolom.

### 3.3 IDENTIFIKACIJA *C. albicans*

#### KATALAZNI TEST

Katalazni test je eden od osnovnih biokemijskih testov za dokazovanje prisotnosti encima katalaze v celicah organizmov. Encim katalaza razgrajuje toksičen  $H_2O_2$  (vodikov peroksid) na vodo in kisik, ki nastaja v celicah tako prokariontov kot evkariontov in sicer kot stranski produkt aerobnega metabolizma.

Material:

- čista kultura
- cepilna zanka
- 3 % vodikov peroksid
- petrijevka

Postopek dela:

S petrijevke smo s cepilno zanko prenesli eno poraslo čisto kolonijo ter nanjo kapnili eno kapljico vodikovega peroksida. Ves čas procesa smo opazovali delovanje penjenje. Penjenje potrjuje prisotnost kisika (slika 11), kot stranskega produkta katalazne reakcije s peroksidom. S tem potrdimo dejstvo, da naša aerobna kultura sintetizira encim katalazo ter s tem vodikov peroksid razgradi na neškodljiva produkta, na kisik in vodo.



Slika 11: Penjenje kulture pri katalaznem testu (Vir fotografije: osebni arhiv)



## ENOSTAVNO BARVANJE

Opazovanje neobarvanih preparatov je pogosto neuspešno, saj so nekontrastni in je zato morfologija celic manj vidna. Ena izmed pogostejših metod barvanja, ki nam omogoča lažjo identifikacijo in diferenciacijo predvsem, ko želimo videti jasne oblike mikroorganizmov je enostavno barvanje. Pri tem barvanju uporabljamo le eno vrsto barvila. Za boljši kontrast smo uporabili metilensko modrilo.

Material:

- metilensko modrilo
- gorilnik
- cepilna zanka (ali eza)
- objektno stekelce
- papirnata brisača ali vata
- odlagalnik za objektna stekelca
- kadička za spiranje
- puhalka z destilirano vodo
- rokavice
- mikroskop
- imerzijsko olje
- kultura

Postopek dela:

Mikroskopske preparate smo pripravili tako, da smo majhen del kulture z ezo nanесли na objektno steklo in naredili tanek razmaz po sredini stekla. Razmaz smo fiksirali z nekaj potegi čez ogenj. Na fiksiran razmaz smo nato kapnili kapljico metilenskega modrila. Metilensko modrilo smo pustili delovati 60 sekund. Po odlitju barvila smo preparat rahlo sprali z destilirano vodo. Osušen preparat smo nato pogledali pod mikroskopom, najprej pri manjših povečavah in po dodatku imerzijskega olja še pod imerzijskim objektivom z največjo povečavo mikroskopa (1000-kratna).

Z mikroskopiranjem smo glede morfoloških lastnosti (oblika celic) preverjali prisotnost *C. albicans* v naših vzorcih. Preparate smo opazovali pod 40-, 100-, 400- in 1000-kratno povečavo.

## 3.4 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM

### PRIPRAVA PERKOLATOV

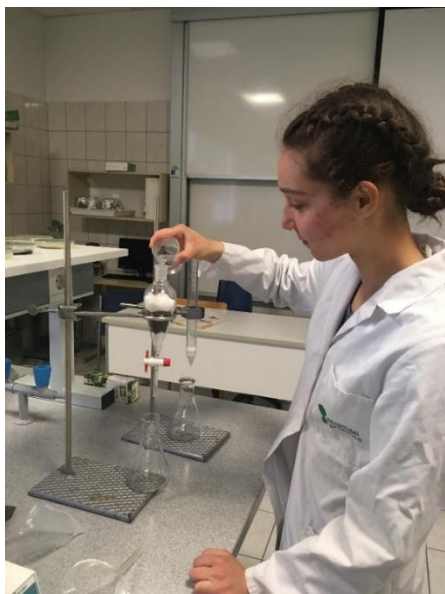
#### 3.4.1.1 PERKOLAT ZELENEGA ČAJA

Material:

- perkolator
- vata
- zeleni čaj (22,27 g)
- prekuhana voda (100 mL)
- erlenmajerico

Postopek dela:

S pomočjo laboratorijske steklovine in drugih pripomočkov smo sami izdelali perkolator za ekstrakcijo trdnih snovi. Najprej smo zaprli odprtino perkolatorja ter posušene delce zelenega čaja namestili med dve plasti vate (Slika 12). To smo prelili z vročo vodo in pustili stati pol ure. Odprtino perkolatorja smo nato odprli in počakali, da je perkolat počasi stekel v erlenmajerico (Slika 13).



Slika 12: Priprava perkolata zelenega čaja (Vir fotografije: osebni arhiv)



Slika 13: Perkolat zelenega čaja (Vir fotografije: osebni arhiv)

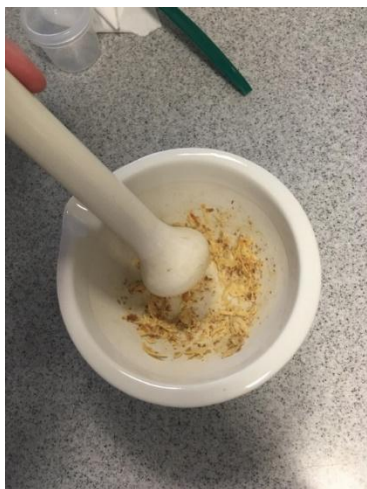
### 3.4.1.2 PERKOLAT SEMEN GRENIVKE

Material:

- perkolator
- vata
- grenivkine peške (1,81 g)
- prekuhana voda (20 mL)
- čaša
- terilnica
- injekcija za mikrofiltracijo
- mikrofiltri velikosti por 0,45  $\mu\text{m}$

Postopek dela:

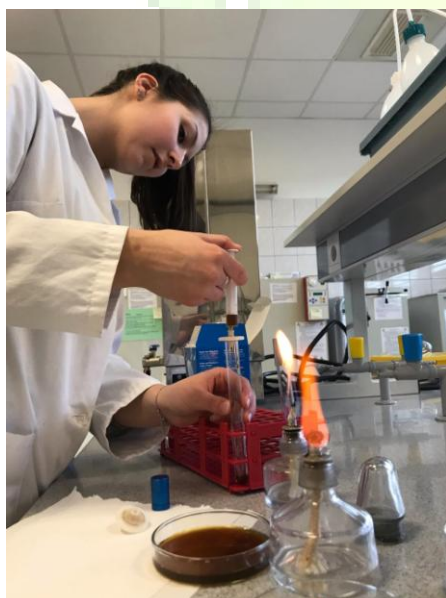
Najprej smo semena grenivke (peške) strli v terilnici na čim manjše delce (Slika 14). Nato smo sestavili perkolator, zaprli odprtino perkolatorja ter zmlete peške dali med dve plasti vate. Vse skupaj smo počasi zalili z vročo vodo in pustili stati dve uri, da je ekstrakcija lahko dobro potekala. Odprtino smo nato odprli in počakali, da se je perkolat počasi nakapljaj v predložko (Slika 15). Oba perkolata smo nato prefiltrirali skozi mikrofilter Chromafil za vodne ali polarne medije z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$  (Slika 16). Prefiltrirali smo jih v sterilne epruvete. Prefiltrirane vzorce ekstraktov smo nato takoj uporabili za nadaljnje delo antibiograma.



Slika 14: Trenje grenivkinih pešk (Vir fotografije: osebni arhiv)



Slika 15: Perkolator (Vir fotografije: osebni arhiv)



Slika 16: mikrofiltriranje perkolatov (Vir fotografije: osebni arhiv)

## PRIPRAVA ANTIMIKOTIČNIH DISKOV

Material:

- propolis brez alkohola (Medex)
- perkolat zelenega čaja
- perkolat grenivkinih pešk
- sterilni diski

Potek dela:

Najprej smo pripravili dvoplastne okrogle diske iz filtrirnega papirja. Prenesli smo jih v sterilizator in jih sterilizirali za 1 uro na 180 °C. Nato smo jih aseptično pomočili v vse tri pripravke potencialnih antimikotičnih učinkovin (perkolat zelenega čaja, perkolat semen grenivke, vodno suspenzijo propolisa) in jih v sušilniku 2 uri sušili pri temperaturi 50 °C (Slika 17).



Slika 17: Namakanje sterilnih diskov v propolisu (Vir fotografije: osebni arhiv)

## IZVEDBA DIFUZIJSKEGA ANTIBIOGRAMA

Material:

- fiziološka raztopina
- gojišče s kulturo
- petrijevke z gojiščem 5 % krvni PDA agar s kloramfenikolom
- antimikotični diski
- eza
- gorilnik
- hokejke
- stresalnik
- pipeta

- žogica za pipetiranje

Potek dela:

Z ezo smo v epruveto s 5 mL fiziološke raztopine prenesli z gojišča po dve izolirani koloniji *C. albicans* in stresali na stresalniku. Nato smo na ugotovljeno najugodnejše gojišče (5 % krvni PDA agar s kloramfenikolom) aseptično odpipetirali 2 mL suspenzije celic *C. albicans* ter s hokejko razmazali po celi površini gojišča. Nato smo na sredino vsake polovice petrijevke nanegli en disk (dve paralelki). Za vsako učinkovino smo porabili 3 petrijevke in 6 diskov, kar pomeni 6 paralelk za vsak vzorec pripravka, potencialnega antimikotika. Gojišča smo inkubirali 3 dni pri 37 °C.



## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI PO PRVI NACEPITVI , INKUBACIJI in KATALAZNEM TESTU

V fazi prve nacepivitve smo gojiščem dodali potencialne spodbujevalce rasti za glivo *C. albicans*. Odločili smo se za dodatek kave in mleka, saj sta ti dve hranili v dieti za bolnike s kandido, pogosto odsvetovani. Na Sabouraud maltose agarju smo pri prvi osebi uspeli vzgojiti dobro vidno razrast pri dodatku 5 % kave (Tabela 1). Pri 10 % in 20 % dodanega mleka pa smo opazili majhne svetleče kolonije kvasovk. Pri drugi in tretji osebi na tem gojišču kolonij ni bilo (Tabela 2,3).

Tabela 1: Rezultati kultivacije kvasovk brisa ustne sluznice osebe 1

<b>MORFOLOŠKE LASTNOSTI: oseba 1</b>				
<b>GOJIŠČA</b>	brez dodatka			
<b>SAUBORAUD(maltose agar)</b>	ni očitne rasti	<b>5% kave:</b> dobro vidna razrast	<b>10% kave:</b> dobro vidna razrast	<b>20% kave</b>
		<b>5% mleka:</b> ni očitne rasti	<b>10% mleka:</b> majhne, svetleče kolonije kvasovk	<b>20% mleka:</b> majhne, svetleče kolonije kvasovk
<b>YGC-agar</b>		<b>5% kave</b>	<b>5% mleka</b>	
<b>KRVNI AGAR (PDA gojišče s krvjo in antibiotikom kloramfenikolom)</b>	dobro vidna razrast kvasovk, kolonije so velike	<b>5% kave:</b> dobro vidna razrast po celotnem gojišču, kvasovke	<b>5% mleka:</b> dobro vidna razrast	
<b>BRAIN-HEART BROTH</b>		<b>5% kave:</b> sprememba barve gojišča	<b>5% mleka:</b> sprememba barve gojišča	

Legenda:

- Sivo obarvane celice tabele predstavljajo razrast kulture, ki je bila katalazno negativna in smo jo po analizi zavrgli. Če razrasti ni bilo, so celice tabele prazne, v nasprotnem primeru smo razrast razdelili na: ni očitne razrasti/dobro vidna razrast/razrast po celotnem gojišču.
- Barvasto obarvane celice tabele predstavljajo razrast kulture, ki je katalazno pozitivna in, ki smo jo obdržali za naslednje preiskave. Rdeča barva predstavlja kavo in temnejša kot je barva, večja koncentracija le te je bila dodana gojišču. Modra barva predstavlja mleko. Enako velja, da temnejša barva pomeni večjo koncentracijo v gojišču. Neobarvane celice tabele prikazujejo razrast na osnovnem gojišču.



Tabela 2: Rezultati kultivacije kvasovk brisa ustne sluznice osebe 2

<b>MORFOLOŠKE LASTNOSTI: oseba 2</b>				
GOJIŠČA	brez dodatka			
<b>SAUBORAUD(maltose agar)</b>		<b>5% kave</b>	<b>10% kave:</b>	<b>20% kave</b>
		<b>5% mleka</b>	<b>10% mleka:</b> ni očitne rasti	<b>20% mleka:</b> ni očitne rasti
<b>YGC-agar</b>		<b>5% kave</b>	<b>5% mleka</b>	
<b>KRVNI AGAR (PDA gojišče s krvjo in antibiotikom kloramfenikolom)</b>		<b>5% kave:</b> dobro vidna razrast kolonij, domnevno kvasovke	<b>5% mleka</b>	
<b>BRAIN-HEART BROTH</b>	sprememba barve gojišča	<b>5% kave:</b> sprememba barve gojišča	<b>5% mleka:</b> sprememba barve gojišča	

Tabela 3: Rezultati kultivacije kvasovk brisa ustne sluznice osebe 3

<b>MORFOLOŠKE LASTNOSTI: oseba 3</b>				
GOJIŠČA	brez dodatka			
<b>SAUBORAUD(maltose agar)</b>		<b>5% kave</b>	<b>10% kave</b>	<b>20% kave</b>
		<b>5% mleka</b>	<b>10% mleka:</b> ni očitne rasti	<b>20% mleka:</b> ni očitne rasti
<b>YGC-agar</b>		<b>5% kave</b>	<b>5% mleka</b>	
<b>KRVNI AGAR (PDA gojišče s krvjo in antibiotikom kloramfenikolom)</b>	razrast po celotnem gojišču	<b>5% kave:</b> dobro vidna razrast majhnih kolonij	<b>5% mleka:</b> razrast po celotnem gojišču	
<b>BRAIN-HEART BROTH</b>		<b>5% kave</b>	<b>5% mleka</b>	

Legenda:

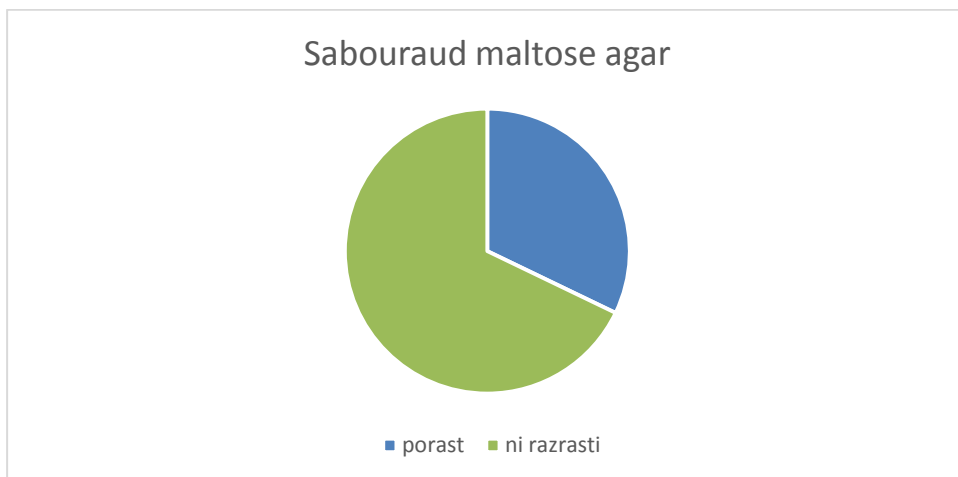
- Sivo obarvane celice tabele predstavljajo razrast kulture, ki je bila katalazno negativna in smo jo po analizi zavrgli. Če razrasti ni bilo, so celice tabele prazne, v nasprotnem primeru smo razrast razdelili na: ni očitne razrasti/dobro vidna razrast/razrast po celotnem gojišču.
- Barvasto obarvane celice tabele predstavljajo razrast kulture, ki je katalazno pozitivna in, ki smo jo obdržali za naslednje preiskave. Rdeča barva predstavlja kavo in temnejša kot je barva, večja koncentracija le te je bila dodana gojišču. Modra barva predstavlja mleko. Enako velja, da temnejša barva pomeni večjo koncentracijo v gojišču. Neobarvane celice tabele prikazujejo razrast na osnovnem gojišču.

Tabela 4: Rezultati kultivacije kvasovk brisa ustne sluznice osebe 4

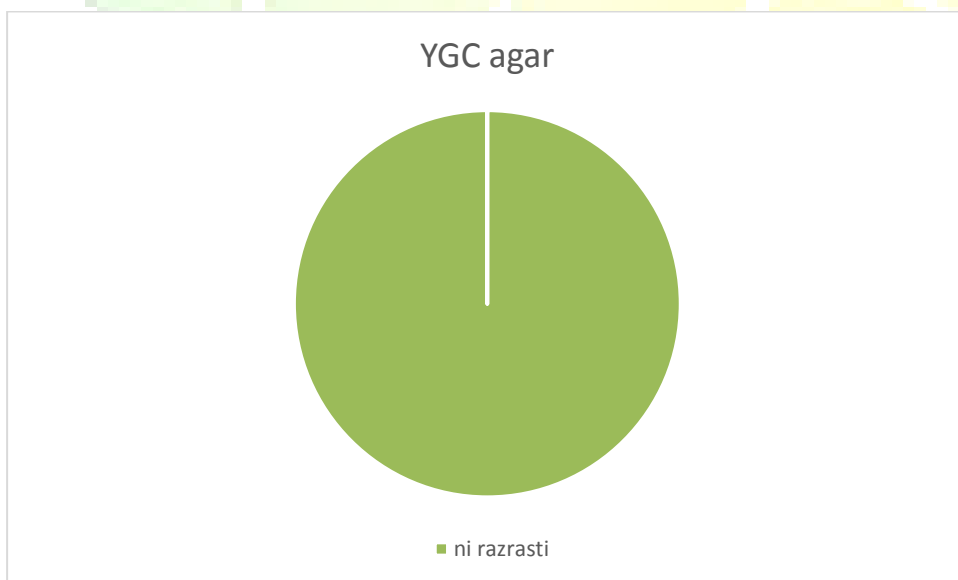
<b>MORFOLOŠKE LASTNOSTI: oseba 4</b>				
<b>GOJIŠČA</b>	<b>brez dodatka</b>			
<b>SAUBORAUD(maltose agar)</b>		<b>5% kave</b>	<b>10% kave:</b> tri velike kolonije, ki spominjajo na plesen, vršajasta razrast	<b>20% kave:</b> velika kolonija, ki spominja na plesen, vršajasta razrast
		<b>5% mleka:</b> velika okrogla kolonija bele barve	<b>10% mleka:</b> 4 kolonije, dobro vidna razrast, ki spominja na plesen	<b>20% mleka:</b> ena večja kolonija, bela
<b>YGC-agar</b>		<b>5% kave</b>	<b>5% mleka</b>	
<b>KRVNI AGAR (PDA gojišče s krvjo in antibiotikom kloramfenikolom)</b>	9 kolonij, domnevno kvasovke	<b>5% kave:</b> razrast majhnih belih kolonij čez celotno petrijevko	<b>5% mleka:</b> 11 majhnih belih kolonij, ki so domnevno kvasovke	
<b>BRAIN-HEART BROTH</b>		<b>5% kave</b>	<b>5% mleka</b>	

Legenda:

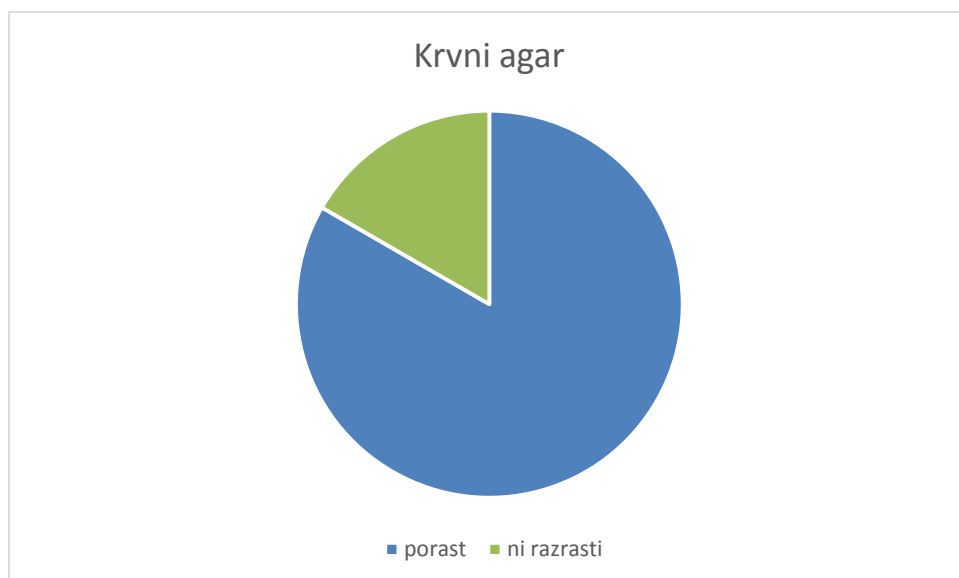
- Sivo obarvane celice tabele predstavljajo razrast kulture, ki je bila katalazno negativna in smo jo po analizi zavrgli. Če razrasti ni bilo, so celice tabele prazne, v nasprotnem primeru smo razrast razdelili na: ni očitne razrasti/dobro vidna razrast/razrast po celotnem gojišču.
- Barvasto obarvane celice tabele predstavljajo razrast kulture, ki je katalazno pozitivna in, ki smo jo obdržali za naslednje preiskave. Rdeča barva predstavlja kavo in temnejša kot je barva, večja koncentracija le te je bila dodana gojišču. Modra barva predstavlja mleko. Enako velja, da temnejša barva pomeni večjo koncentracijo v gojišču. Neobarvane celice tabele prikazujejo razrast na osnovnem gojišču.



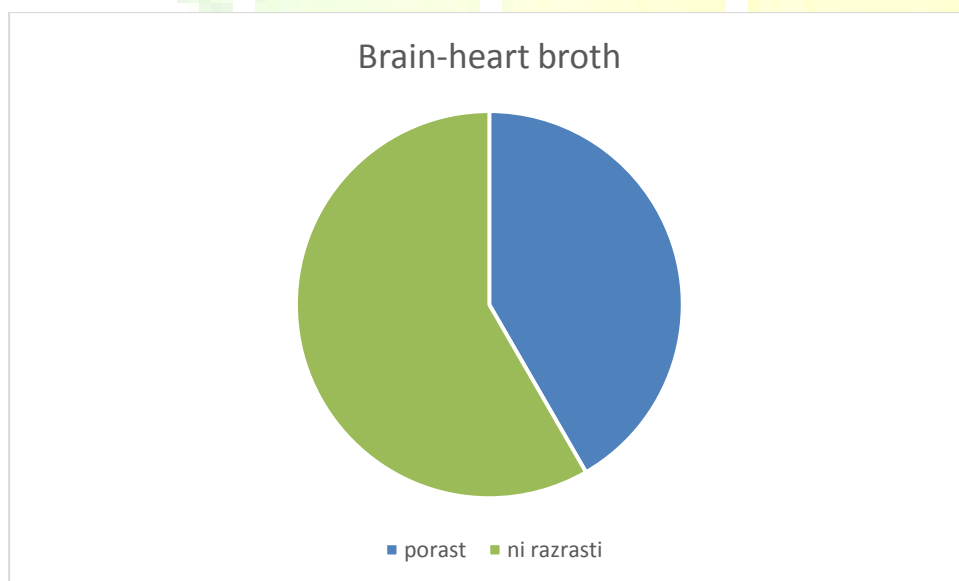
**Grafikon 1: Prikaz porasti *C. albicans* na Sabouraud maltose agarju**



**Grafikon 2: Prikaz porasti *C. albicans* na YGC agarju**



Grafikon 3: Prikaz porasti *C. albicans* na krvnem agarju



Grafikon 4: Prikaz porasti *C. albicans* v Brain-heart broth agarju

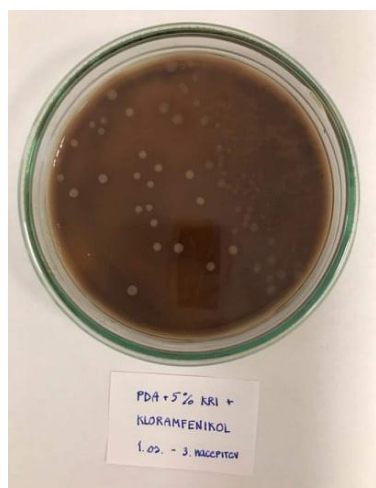
Pri četrti osebi smo na gojišču z 10 % in 20 % kave opazili velike kolonije, ki so spominjale na plesen (Tabela 4). Na YGC gojišču ni bilo razrasti. Na krvnem agarju so pri prvi osebi na petrijevki brez dodatkov, z dodatkom 5 % mleka in kave prisotne kolonije, ki so porasle celo površino petrijevki in spominjajo na kvasovke (Tabela 1). Pri drugi osebi je vidna razrast kolonij, domnevno kvasovk le na gojišču z dodatkom 5 % kave (Tabela 2). Tudi pri tretji osebi je razrast kolonij po celem gojišču na petrijevki brez dodatka in na petrijevki z dodatkom mleka in kave (Tabela 3). Pri četrti osebi je bilo na gojišču brez dodatkov prisotnih 9 kolonij kvasovk, tudi pri obeh gojiščih z dodatkom pa so majhne bele okrogle kolonije

porasle celotno površino petrijevke (Tabela 4). Na Brain-Hearth Broth gojišču se je pri vzorcu prve osebe v epruveti z dodatkom 5 % mleka in 5 % kave spremenila barva gojišča, prav tako se je to zgodilo pri vzorcu druge osebe (Tabela 1,2). Pri vzorcu tretje in četrte osebe sprememb ni bilo (Tabela 3,4).

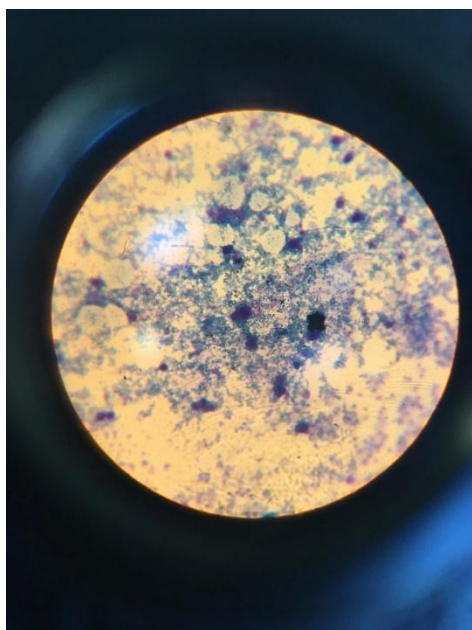
## 4.2 PO DRUGI NACEPITVI IN INKUBACIJI

Po uspešni razrasti prvih kultur na 52 petrijevkah z različnimi gojišči smo vse katalazno pozitivne vzorce (20) prenesli na selektivno gojišče: krvni agar (PDA gojišče s krvjo in antibiotikom kloramfenikolom), ki smo ga sami sestavili na podlagi naših ugotovitev poskusov uspešne rasti (Tabela 1-4). Z ezo smo z gojišča vzeli po dve kulturi, jih dali v sterilno fiziološko raztopino, stresali na stresalniku, prenesli na gojišče in aseptično s hokejko razmazali po gojišču. Preparate smo enostavno barvali z metilenskim modrilom in mikroskopirali ter našli večje okrogle kvasovke – *C. albicans*. Kolonije so na gojišču majhne, bele, okroglaste, rahlo izbočene, neprosojne in enotne strukture z rahlim leskom (Slika 18).

Celice kvasovk *C. albicans* lahko prepoznamo po okrogli obliki. Celična stena celic prevzame modro barvo metilenskega modrila, zato se lepo modro obarvajo (Slika 19). S pomočjo enostavnega barvanja in opazovanja pod mikroskopom smo ugotovili, da je njihova velikost celic 5  $\mu\text{m}$ .



Slika 18: Gojišče (5% krvni PDA agar s kloramfenikolom) s kultivacijo *C. albicans* (Vir fotografije: osebni arhiv)



Slika 19: Kandida pod 400x povečavo (Vir fotografije: osebni arhiv)

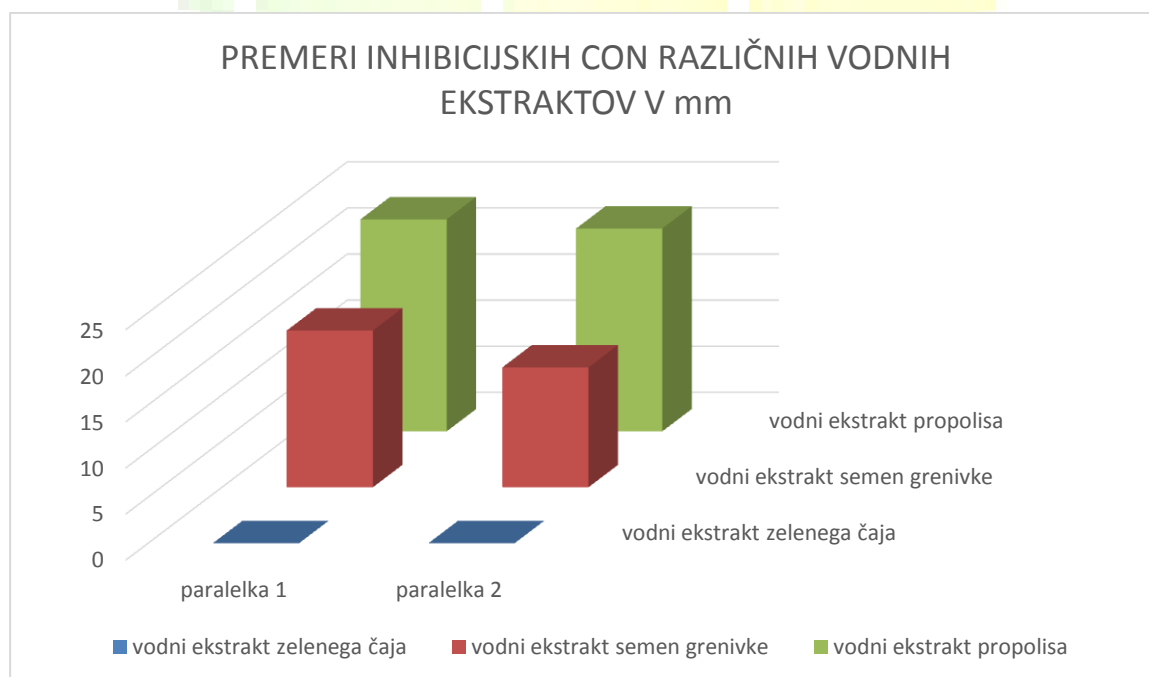
#### 4.3 REZULTATI DIFUZIJSKEGA ANTIBIOGRAMA

Po inkubaciji smo primerjali in izmerili inhibicijske cone vseh treh učinkovin (perkolat zelenega čaja, perkolat grenivkinih semen, vodna suspenzija propolisa) ter ugotovili, da najmanj zaviralno na rast *C. albicans* deluje ekstrakt zelenega čaja, kjer so kolonije zrasle čisto ob disku in porasle celotno površino gojišča (Slika 20). Inhibicijska cona pri grenivkinih peškah je imela povprečen premer inhibicijske cone 15 mm (Slika 21). Najboljši antimikotičen učinek na *C. albicans* pa je imel vodni ekstrakt propolisa, kjer je povprečen premer inhibicijske cone meril 22,5 mm (Slika 22). Za vsak primer difuzijskega antibiograma smo opravili po 2 paralelki enakih diskov potencialnih antimikotičnih učinkovin (tabela 5).

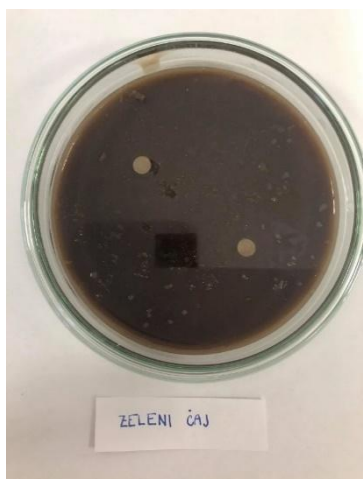


**Tabela 5: Rezultat inhibicijskih con- ugotavljanje antimikotičnega delovanja na kvasovko *C. albicans***

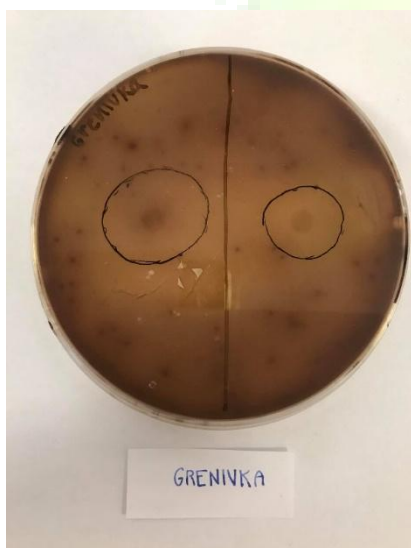
	ANTIMIKOTIČNA UČINKOVINA	PREMER INHIBICIJSKE CONE (2 paralelki)	
1.	Vodni ekstrakt zelenega čaja	0 mm	0 mm
2.	Vodni ekstrakt semen grenivke	17 mm	13 mm
3.	Vodni ekstrakt propolisa	23 mm	22 mm



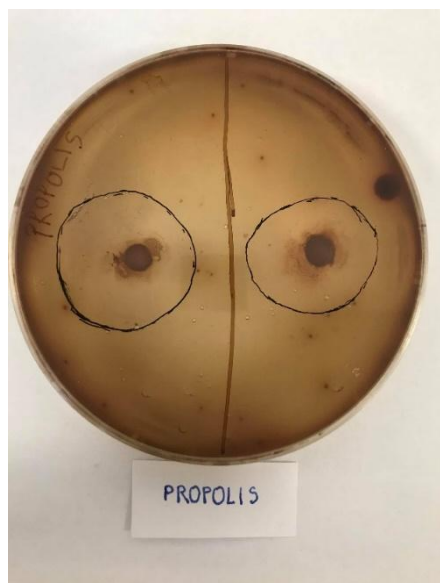
**Figure 5: Premeri inhibicijskih con različnih vodnih ekstraktov v mm na gojišču poraslem s *C. albicans***



Slika 20: Difuzijski antibiogram zelenega čaja na gojišču 5% krvnega PDA s kulturo *C. albicans* (Vir fotografije: osebni arhiv)



Slika 21: Difuzijski antibiogram semen grenivke na gojišču 5% krvnega PDA s kulturo *C. albicans* (Vir fotografije: osebni arhiv)



**Slika 20: Difuzijski antibiogram propolisa na gojišču 5% krvnega PDA s kulturo *C. albicans* (Vir fotografije: osebni arhiv)**

## 5 RAZPRAVA

Cilj naše raziskovalne naloge je bil ugotoviti, katera naravna učinkovina najbolj zavira rast *C. albicans*. Primerjali smo vodne ekstrakte treh naravnih snovi: zeleni čaj, grenivkine peške in propolis, saj so se te najpogosteje pojavljale v prebrani literaturi kot možne ali celo učinkovite pri zdravljenju glivičnih obolenj. *C. albicans* je gliva, ki povzroča kandidozo. Lahko se razraste v ustih, nožnici ali na koži in nam povzroča težave.

Na začetku raziskovanja smo si z raziskovalno nalogo z naslovom “Dokazovanje antimikotičnega delovanja vodnih ekstraktov na kvasovko *Candida albicans*”, prizadevali izolirati čisto kulturo omenjene glive iz vzorcev brisov ustne votline štirih različnih oseb. Ker je bila naša želja pridobiti čim večjo razrast za uporabo kolonij pri nadaljnjem raziskovanju, smo poleg štirih gojišč (Sauboraud maltose agar, krvni agar, YGC, Brean-Hearth broth), dodajali še dodatek kave in mleka. Prav tako smo vzporedno pripravili tudi eksperiment, kako različne koncentracije dodatkov kave in mleka vplivajo na rast. Ker smo dobili razrast kolonij na skoraj vseh petrijevkah, njihove morfološke lastnosti pa so se med seboj razlikovale, smo opravili tudi biokemijske in morfološke teste identifikacije *C. albicans*. Katalazno pozitivne kolonije smo preverili pod mikroskopom z obarvanjem preparatov z metilenskim modrilom.

Čeprav je znano, da je kandida del običajne mikroflore človeka, je bil najtežji del naloge ravno vzgojiti le-to na gojišču. Vse osebe so imele le sum na to, da imajo kandidozo, kajti za to niso opravili direktnih testov. Bris smo vzeli štirim različnim osebam ter kvasovke gojili na več kot petdesetih petrijevkah. Na koncu smo *C. albicans* identificirali le na eni od teh. Potrdili smo jo na podlagi pozitivnega katalaznega testa in morfoloških značilnosti, vidnih pod 400x povečavi mikroskopa.

Da smo zavrgli sum na razrast kakršnekoli vrste bakterij, smo uporabili selektivno gojišče PDA z antibiotikom kloramfenikolom. Temu smo dodali defibrinogenizirano ovčjo kri, saj smo ugotovili, da kandida na krvnem agarju najbolje uspeva. Priprava gojišča je zahtevala veliko natančnosti in hitrega dela. Pozorni smo morali biti na temperaturo gojišča preden smo mu dodali kri, saj se gojišče s segrevanjem do 40 °C ne utekočini, ovčja kri pa pri temperaturi

nad 45 °C koagulira. Za pripravo gojišča in nato prelivanje smo morali torej loviti temperaturo okrog 42 °C.

Razrast kulture na petrijevki s PDA krvnim agarjem, kjer smo izolirali in identificirali *C. albicans*, je bila dovolj velika, da nam je ni bilo treba ponovno namnoževati. Tako smo se lahko takoj lotili izvedbe metode difuzijskega antibiograma. Najprej smo pripravili perkolate rastlinskih pripravkov. Perkolacija je trajala toliko časa, dokler niso kapljice prenehale kapljati v čašo pod perkolatorjem. Tu smo se spraševali ali bi bila ekstrakcija uspešnejša, če bi biološki material (zeleni čaj, zdrobljene peške grenivke) zalili z vročo vodo. Mi smo se namreč odločili, da bomo biološki material zalili s toplo vodo, okrog 35 °C.

Za izvedbo difuzijskega antibiograma smo uporabili krvni agar, saj se je *C. albicans* na njem najbolje razrasla. Največjo težavo nam je pri antibiogramu predstavljala razrast *C. albicans*, ki ni bila tako konfluentna, kot smo želeli. Vendar, če bi na gojišče nanесли več kot 2 mL suspenzije, bi diski plavali nad gojiščem in učinkovine ne bi enakomerno difundirale v gojišče. Verjetno smo pripravili prenizko koncentrirano suspenzijo s celicami kvasovk za razmaz po gojišču za antibiogram. Zato tudi razrast ni bila popolnoma strnjena oz. konfluentna. Poleg tega pa bi bilo potrebno v bodoče gojišču dodati še 5 % ekstrakta kave na celoto gojišča kot dodatnega stimulansa rasti.

Skozi celotno laboratorijsko delo bi se morale zavzemati za boljše slike, da bi bile kolonije in njihova porast lepše vidne, predvsem pa pri difuzijskem antibiogramu, da bi bile inhibicijske cone opaznejše. Prav tako bi v prihodnje morale dobiti vzorce večih oseb s sumom na kandido, saj bi bili rezultati bolj podrobni in reprezentativni, vendar smo že zdaj imele težavo najti prostovoljce s sumom na okužbo s kandido.

## 6 ZAKLJUČEK

Z raziskovalno nalogo smo postavili nekaj delovnih hipotez. Na osnovi literature, da je gliva *C. albicans* del normalne flore pri človeku, smo sklepali, da bomo vzorce za identifikacijo čiste kulture lahko pridobili z brisom ustne votline. Hipotezo lahko potrdimo, saj smo na koncu iz brisa ene osebe uspeli izolirati in identificirati omenjeno biokulturo in na njej izvesti metodo difuzijskega antibiograma.

Naslednjo hipotezo, kjer smo domnevali, da bosta kava in mleko kot dodatek gojišču omogočila boljšo rast kvasovke *C. albicans* lahko delno potrdimo, vendar se razrast razlikuje po količini dodanih spodbujevalcev rasti. Opazili smo tudi, da je pri večini oseb kava (5% dodatka ekstrakta kave) pozitivno vplivala na razrast kulture. Pri dodatku mleka ni bilo izjemnih rezultatov rasti kvasovk.

Našo hipotezo, da bomo kvasovko *C. albicans* lahko identificirali na podlagi enostavnega barvanja z metilenskim modrilom ter mikroskopiranja in ugotavljanja aktivnosti encima katalaze, lahko delno sprejmemo. Po prvi nacepitvi smo na koloniji vsake izmed petrijevok izvedli katalazni test in obdržali le katalazno pozitivne kolonije, saj smo v literaturi zasledili, da so celice kvasovk *C. albicans* katalazno pozitivne. Po opravljenem biokemijskem testu smo kolonije iz preostalih petrijevok fiksirali na objektno steklo in jih enostavno pobarvali z metilenskim modrilom ter opazovali celice kvasovk poobliki in velikosti. Po izvajanju teh dveh identifikacijskih metod, nam je ostalo 20 petrijevok. Kolonije iz teh petrijevok smo najprej prenesli v fiziološko raztopino, jih stresali, nato pa prenesli na nova gojišča PDA z dodatkom antibiotika kloramfenikola in dodatkom 5 % krvi. PDA gojišču, ki je gojišče za razrast gliv smo dodali antibiotik, da bi preprečil rast bakterij, kri pa smo dodali, da bi se približali naravnim pogojem rasti že omenjene kvasovke. Po tridnevni inkubaciji sta nam preostali le še dve petrijevki, porasli z belimi okroglimi kolonijami. Prisotnost glive *C. albicans* smo s pomočjo mikroskopiranja dokazali samo še na eni petrijevki. Kolonije iz petrijevke, na kateri smo dokazali prisotnost kandidate, smo uporabili za nadaljna testiranja z diski za difuzijski antibiogram.

Hipotezo, da bodo perkolat grenivkinih pešk, perkolat zelenega čaja in vodni ekstrakt propolisa na rast kvasovke *C. albicans* učinkovali zaviralno, lahko delno potrdimo.



Pričakovali smo, da bodo vse tri učinkovine delovale zaviralno. Perkolat zelenega čaja ni zaviral rast kandidate. Zaviralen učinek je bil prisoten pri ekstraktu grenivkinih pešk, najbolj pa pri propolisu, pri katerem so bile inhibicijske cone največje.

Skozi raziskovalno nalogo smo dokazali, da je pot do izolacije čiste kulture *C. albicans* kompleksna ter zahteva veliko različnih metod laboratorijskega dela. Ob koncu eksperimenta lahko potrdimo, da je *C. albicans* možno kultivirati na PDA krvnem agarju z dodatkom antibiotika kloramfenikola. Rast pa lahko še dodatno vzpodbudimo z dodatkom vsaj 5% dodatka ekstrakta kave gojišču. Kvasovka je precej agresivna, saj so izbrane antimikotične učinkovine v najboljšem primeru delovale zaviralno na rast, a je niso popolnoma preprečile. Pri zelenem čaju, ki ni deloval zaviralno, so se kolonije razrasle popolnoma do diska, večje inhibicijske cone pa smo zabeležili pri perkolatu grenivkinih pešk in še večje pri ekstraktu propolisa.

Na podlagi rezultatov, osebam, ki trpijo za kandidozo sluznic, odsvetujemo uživanje kave, saj je pri nekaterih osebah pozitivno vplivala na razrast *C. albicans*.

Po rezultatih difuzijskega antibiograma pa lahko za zdravljenje kandidoze (v primeru kožnih in sluzničnih okužb) svetujemo zunanjo uporabo vodne suspenzije propolisa ali perkolata grenivkinih pešk, saj zavirata rast kandidate.

## 7 VIRI IN LITERATURA

### 7.1 LITERATURA

- Gubina, M. in Ihan, A. (2002). *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana: Medicinski razgledi.
- Lončar, S. in Dolinar, A. (2013). *Obvladajte kandido, preden ona obvladuje vas*. Ljubljana: Jasno in glasno. Str. 81–82, 93–95.
- Orožen Adamič, A. in Sernec, K. (2015). *Mikrobiologija. Učbenik za farmacevtske in kozmetične tehnike*. Ljubljana: DZS. Str. 246–247, 275–277.
- Vesel, V. (2007). *Ukrotite kandido na povsem naraven način*. Ljubljana: Agencija Baribal. Str. 64–65.
- Vrhovnik, K. (2012). *Oblikovanje zdravil. Učbenik za modul Oblikovanje zdravil v programu Farmacevtski tehnik*. Ljubljana: Grafenauer. Str. 126.

### 7.2 ELEKTRONSKI VIRI

- *Dobro v mleku*. Pridobljeno 10. marca 2020 s <https://www.l-m.si/o-mleku/dobro-v-mleku/>.
- *Kava in ajurveda*. Pridobljeno 16. 3. 2020 s <https://ajurjoga.si/kava-in-ajurveda/>.
- *Propolis – spoznajte njegove zdravilne lastnosti*. Pridobljeno 10. marca 2020 s <https://www.bodieko.si/propolis>.
- *Previdno pri uživanju grenivk*. Pridobljeno 16. marca 2020 s <https://www.dnevnik.si/111824>.
- *Propolis*. Pridobljeno 10. marca 2020 s <https://www.lekarnar.com/izdelki/propolis-na-alkoholni-osnovi-kapljice#productTabs>.
- *Science Direct: Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of Candida albicans*. Pridobljeno 29. 3. 2020 s <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874119349682>.

- *Sistemske glivične okužbe*. Pridobljeno 20. marca 2020 s <http://www.medenosrce.net/predmeti/infekcijske-bolezni/82-literatura/1176-sistemske-glivicne-okuzbe>.
- *Seasonal effect of brazilian propolis ON Candida albicans and Candida tropicalis*. Pridobljeno 10. marca 2020 s [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302001000100009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302001000100009&script=sci_arttext).
- *Vse o mleku, laktozi in laktozni intoleranci*. Pridobljeno 16. marca 2020 s <https://www.prehrana.si/clanek/217-vse-o-mleku-laktozi-in-laktozni-intoleranci> *Zeleni čaj*. Pridobljeno 10. marca 2020 s <https://www.gorenjske-lekarne.si/svetovanje-clanek/zeleni-caj>.