

## Polhova mast in protimikrobno učinkovanje

### Dormouse fat and antimicrobial activity

Leon Drame<sup>a</sup>, Sara Skok<sup>a</sup>, Janez Mulec<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnost,  
Inštitut za raziskovanje krasa, Titov trg 2, 6230 Postojna

<sup>b</sup> Univerza v Novi Gorici, Krasoslovno študijsko središče Unesco, Glavni trg 8, 5271 Vipava

\*Korespondenca: janez.mulec@zrc-sazu.si

**Izvleček:** Polhovo mast se še vedno v ljudskem zdravilstvu uporablja za lajšanje številnih zdravstvenih težav, vendar zaenkrat ne obstajajo sistematične raziskave o njeni vlogi kot protimikrobne učinkovine. V sveži pohovi masti, pridobljeni na tradicionalen način ter tudi v tisti, ki je že bila uporabljena, so bili prisotni mikroorganizmi. Polhova mast v poskusu *in vitro* ni izkazala inhibitornega učinka na rast indikatorskih bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus epidermidis*. Protimikrobno učinkovitost, o kateri priča ljudsko zdravilstvo, in jo potrjuje njena stalna uporaba, gre najverjetneje pripisati njeni stimulaciji imunskega sistema gostitelja. Potrebne so nadaljnje raziskave, ki bodo potrdile uporabnost polhove masti oziroma njenih aktivnih sestavnih delov pri zdravljenju mikrobnih okužb z večkratno odpornimi sevi.

**Ključne besede:** mikroorganizmi, polhova mast, protimikrobna učinkovitost

**Abstract:** Dormouse fat continues to be used in traditional medicine to alleviate various health problems but, to date, there has been no systematic research into its role as an antimicrobial agent. Microorganisms have been confirmed as being present both in fresh dormouse fat, that has been produced in a traditional way and in previously applied fat. When studied *in vitro*, dormouse fat showed no inhibitory effect on the growth of the indicator bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. The apparent antimicrobial efficacy attested by its continuing and seemingly successful use in traditional medicine is most likely related to stimulation of the host immune system. Further research is needed to investigate and confirm the usefulness of dormouse fat, or its active components, in the treatment of infections related to multiple resistant microbial strains.

**Keywords:** antimicrobial activity, dormouse fat, microorganisms

## Uvod

Za lajšanje zdravstvenih tegob so si ljudje v preteklosti pomagali na različne načine. Eden izmed tradicionalnih zdravilnih pripravkov, značilen za slovenski prostor, je tudi polhova mast (Peršič 1998). Polhova mast se v ljudskem zdravilstvu uporablja vsestransko in se jo na kožo nanaša pri težavah z bradavicami, brazgotinami, izpuščaji, ranami, urezninami, odrgninami, zlomi, zvini, ozeblinami in oteklina, glivičnimi ter virusnimi (herpes) infekcijami. Poročajo tudi o uspehih pri odpravljanju težav s hemeroidi, prhljajem, koprivnico, luskavico, artritisom, išiasom in revmatizmom. O uspehih pri oralni uporabi poročajo pri angini, gripi, kašlju, vneti sluznici prebavil, zaprtju, težavah z jetri in dvanaestnikom. Polhova mast naj bi bila učinkovita tudi proti raku na želodcu in debelem črevesu.

Ker vsebuje polhova mast visok delež nenasičenih maščobnih kislin (~90%), je tudi pri nižjih temperaturah, npr. -20 °C, v tekočem stanju. Raziskave kažejo, da imata polhova mast in žirovo olje, podobno maščobnokislinsko sestavo, posebej glede vsebnosti metil palmitat, metil oleata, metil linoleata in metil eikozenoata (Štos 2019). Kakovost in kemijska sestava polhove masti je odvisna od prehrane polhov in življenjskega cikla – hibernacije (Fietz in sod. 2005, Šiftar 2020).

Pridobivanje polhove masti se razlikuje pri posameznih pridelovalcih in vključuje počasno taljenje in razpuščanje maščobnega tkiva navadnih polhov *Glis glis* v posodi nad paro, z izpostavljanjem močnim sončnim žarkom, ali pa s cvrtjem v ponvi (Vesel 2016). Zaradi tradicionalnega postopka pridobivanja polhova mast ni sterilna. Zaenkrat ne obstajajo sistematične raziskave o njeni vlogi kot protimikrobne učinkovine oziroma mehanizmi delovanja na imunski sistem. V tej predhodni raziskavi smo želeli preveriti protimikrobno delovanje polhove masti na dveh indikatorskih bakterijskih vrstah, *Escherichia coli* in *Staphylococcus epidermidis*.

## Material in metode

V raziskavi smo uporabili vzorce polhove masti različnih starosti, pridobljenih na tradicionalen način, iz treh lovskih območij (Tab. 1).

V vzorcih smo preverili prisotnosti kultivabilnih mikroorganizmov na šestih mikrobioloških gojiščih (CNA: Colistin Nalidixic Acid, kolistin nalidixična kislina, za selektivno izolacijo po Gramu pozitivnih bakterij, Služba za pripravo gojišč in reagentov IMI MF UL; CHROMID®ESBL: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, široko spektralna  $\beta$ -laktamaza, za izolacijo enterobakterij, ki sintenzirajo  $\beta$ -laktamaze, Biomérieux; KA: krvni agar za gojenje prehransko nezahtevnih bakterij, Služba za pripravo gojišč in reagentov IMI MF UL; MACC: MacConkey agar za selektivno izolacijo po Gramu negativnih enterobakterij glede na sposobnost fermentacije laktoze, Služba za pripravo gojišč in reagentov IMI MF UL; NA: Nutrient agar za neselektivno gojenje različnih mikroorganizmov, Sigma-Aldrich; CHROMID®VRE: Vancomycin-Resistant Enterococci, vankomicin odporni enterokoki, za izolacijo enterokokov, odpornih proti vankomicinu, Biomérieux). Vsako gojišče je bilo enakomerno inokulirano s 100  $\mu$ l polhove masti, vendar so se na površini gojišč zaradi hidrofobnosti vzorca ohranile vidne kapljice masti ves čas inkubacije (Sl. 1A), ki je potekala aerobno 48 ur pri temperaturi 37 °C (CNA, CHROMID®ESBL, KA, MACC, NA in CHROMID®VRE) oziroma sedem dni pri temperaturi 20 °C (NA). Po preteku inkubacije smo številčno ovrednotili koncentracijo mikroorganizmov (kolonijske enote v CFU na mililiter) ter precepili zrasle kolonije. Nadaljnja subkultivacija kolonij iz primarnih plošč v enakih razmerah in na enakih gojiščih ni bila uspešna, kakor tudi ne gojenje v tekočem gojišču LB (Luria broth base, Miller, Sigma).

Za testiranje protimikrobne učinkovitosti polhove masti, ki se kaže v inhibiciji rasti indikatorskega mikroba, smo uporabili dve bakteriji in sicer vrsto *Escherichia coli*, sev DH5 $\alpha$  [*endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1  $\Delta$ lac(lacZYA-argF) ( $\phi$ 80 lacZ  $\Delta$ M15)*] ter sev ST100 bakterije *Staphylococcus epidermidis* (interna zbirka Inštituta za raziskovanje krasa ZRC SAZU). *E. coli* je značilna predstavnica človekovega prebavnega trakta (Eckburg in sod. 2005), *S. epidermidis* pa človekovega kožnega mikrobioma (Otto 2009). Prekonočno kulturo indikatorske bakterije smo postrgali s trdnega gojišča ter jo resuspendirali v 500  $\mu$ l sterilne fiziološke raztopine in jo z vatenko (FLOQSwab, Copan) razmazali na gojišče NA, da smo zagotovili

dovoljšnjo gostoto inokuluma za izvedbo testa, približno  $10^8$  CFU/ml. Na inokulirano gojišče smo nato položili sterilne diske iz filter papirja (Filtrak 388, Spezialpapierfabrik Niederschlag, Nemčija) na katere smo nanесли 5  $\mu$ l vzorca polhove masti. Vzporedno smo na inokulirano gojišče nanесли še dve kapljici vzorca masti (5  $\mu$ l) ter eno od njiju s sterilno plastično mikrobiološko zanko razpotegnili v ravni liniji (Sl. 1B). Pojav cone inhibicije rasti indikatorskega organizma smo preverili po 24 in 48 urah inkubacije pri 37 °C.

## Rezultati in razprava

Rast mikroorganizmov na primarnih selektivnih in neselektivnih gojiščih se je pojavila tako v svežem (polhova mast, pridobljena leta 2020) kot v starejših vzorcih polhove masti (Tab. 1). Barvne reakcije pri kolonijah, zraslih na primarnih ploščah CHROMID®VRE in CHROMID®ESBL, niso bile značilne za odporne seve, glede na posamezno gojišče in navodila proizvajalca. Čiščenje kolonij iz primarnih plošč in njihovo gojenje za nadaljnjo identifikacijo v enakih laboratorijskih razmerah in na enakih gojiščih ni bilo uspešno. V tem in podobnih primerih je zato potrebna previdnost pri interpretaciji rezultatov gojenja. Predvidevamo, da so primarno zrasle bakterije mikroaerofilne, ki za preživetje potrebujejo kisik, za uspešno

rast pa nižje ravni kisika od tistih, ki so prisotne v ozračju in so se vzpostavile v kapljicah masti (Sl. 1A). V nadaljnjih raziskavah polhove masti bo treba posebno pozornost posvetiti tej skupini mikroorganizmov.

Polhova mast je vsebovala spremljajoče mikroorganizme, na katere je treba biti pozoren v procesu zdravljenja in jih bo treba v nadaljnjih raziskavah identificirati. Zaradi prisotnosti mikroorganizmov, morebiti tudi anaerobnih, polhova mast ni primerna za neposreden nanos na odprte rane. Smiselno bo v prihodnje tudi testiranje, ali v polhovi masti preživijo ključni oportunistični in patogeni mikrobi. Polhova mast se v steklenički, ko si jo uporabnik nanese na prste za nanos na obolelo mesto, lahko tudi dodatno kontaminira s kožnim mikrobiomom uporabnika.

Polhova mast *in vitro* ni inhibirala rasti indikatorskih bakterij *E. coli* (Sl. 1B) in *S. epidermidis*. Inhibitorna oziroma protimikrobna učinkovitost polhove masti o kateri govori ljudsko zdravilstvo, se lahko izkazuje posredno preko stimulacije imunskega odgovora gostitelja. Polhova mast oziroma njeni prečiščeni sestavni deli bi zato lahko predstavljali alternativno možnost pri zdravljenju okužb z večkratno odpornimi sevi. Preučiti bo torej treba tudi morebiten vpliv metabolnih produktov mikrobiote polhove masti na hitrejši potek zdravljenja. Vsekakor bo treba ponovno poskusiti z izolacijo in identifikacijo mikroor-

**Tabela 1:** Kolonijsko število mikroorganizmov v polhovi masti na primarnih ploščah.

**Table 1:** Colony-forming units of microorganisms in dormouse fat inoculated onto primary plates.

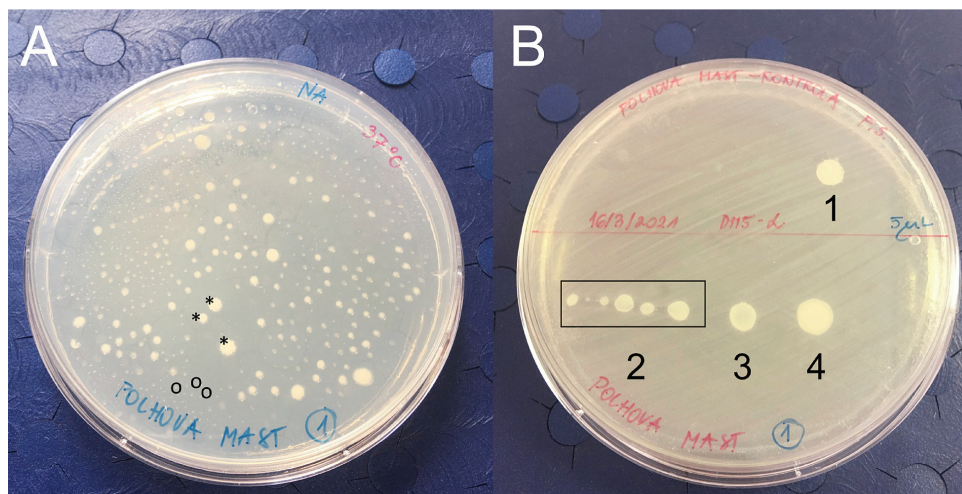
|                           | Kolonijsko število mikroorganizmov (CFU/ml) v polhovi masti iz treh lovskih področij (leto produkcije) |                 |                    |
|---------------------------|--|-----------------|--------------------|
|                           | LD Babno Polje (2011)  | LD Rakek (2020) | LD Senožeče (2013) |
| NA <sup>1</sup>           | 460  | 2370            | 4320               |
| NA <sup>2</sup>           | 1990   | 3570            | 0                  |
| CHROMID®ESBL <sup>2</sup> | 1970   | 17320           | 710                |
| CHROMID®VRE <sup>2</sup>  | 6350   | 1060            | 0                  |
| CNA <sup>2</sup>          | 10   | +               | +                  |
| MACC <sup>2</sup>         | 260  | 2190            | 4170               |
| KA <sup>2</sup>           | 30   | +               | 130                |

Oznake: <sup>1</sup>, 20 °C, 7 dni; <sup>2</sup>, 37 °C, 48 ur; +, prisotnost rasti; NA, nutrient agar; CHROMID®ESBL, Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, široko spektralna  $\beta$ -laktamaza; CHROMID®VRE, Vancomycin-Resistant Enterococci, vankomycin odporni enterokoki; CNA, Colistin Nalidixic Acid, kolistin nalidiksična kislina; MACC, MacConkey agar; KA, krvni agar

ganizmov v polhovi masti ter ugotoviti stalnost vrstne sestave ter njeno delovanje na izbrane indikatorske, tudi večkratno odporne, potencialno patogene bakterijske vrste. Čeprav nismo dokazali neposredne protimikrobne učinkovitosti polhove masti na testiranih bakterijah, s pričujočim zapisom želimo spodbuditi nadaljnje proučevanje obstoječih tradicionalnih receptor ljudskega zdravilstva ter njihovo znanstveno ovrednotenje v luči razširjenja mikroorganizmov, odpornih proti protimikrobnim učinkovinam.

## Zahvala

Raziskovalni program št. P6-0119 je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna. Za pomoč pri izvedbi poskusa se avtorji zahvaljujejo Marku Prudiču, Roku Tomazinu ter Heleni Dobrovoljce in Davidu Lowe za terminološko svetovanje.



**Slika 1:** Mikrobiološko testiranje, primer vzorca polhove masti iz lovskega področja LD Rakek. **A** - rast bakterijskih kolonij (obarvane pike, \*) na primarni plošči NA in kapljice masti (prosojne pike, o) brez opazne mikrobne rasti; **B** - testiranje protimikrobne učinkovitosti polhove masti z indikatorskim sistemom *E. coli*: petrijevka nad rdečo horizontalno črto (kontrola), (1) disk namočen v sterilni fiziološki raztopini ter mikrobna prerast; petrijevka pod rdečo črto, (2) odsotnost inhibicije rasti *E. coli* vzdolž linearnega nanosa polhove masti, kjer je prišlo do nastajanja kapljic zaradi hidrofobnosti vzorca, (3) okoli kapljice masti ter (4) okoli diska, namočenega v polhovi masti.

**Figure 1:** Microbiological examination; example of a sample of dormouse fat from the hunting area of LD Rakek. **A** - growth of bacterial colonies (opaque dots, \*) on the primary plate of nutrient agar (NA) and fat droplets (transparent dots, o) without any apparent microbial growth; **B** - testing of antimicrobial activity of dormouse fat using an *E. coli* indicator strain: petri dish above the red horizontal line (control), (1) disc soaked with sterile saline and microbial overgrowth; petri dish below the red line, (2) no inhibition of *E. coli* growth along a linear application of dormouse fat, where droplets formed due to the hydrophobicity of the sample, (3) around a fat droplet and (4) around the disc soaked with dormouse fat.

## Literatura

- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635-1638.
- Fietz, J., Pflug, M., Schlund, W., Tataruch, F., 2005. Influences of the feeding ecology on body mass and possible implications for reproduction in the edible dormouse (*Glis glis*). *Journal of Comparative Physiology B*, 175, 45-55.
- Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 555-567.
- Peršič, M., 1998. Dormouse hunting as part of Slovene national identity. *Natura Croatica: Periodicum Musei Historiae Naturalis Croatici*, 7, 199-211.
- Vesel, Š., 2016. Polharji napovedujejo dobro lovno sezono. *Lovec*, 99, 477-479.
- Šiftar, O., 2020. Masnokiselinski sastav različitih tkiva sivog puha (*Glis glis*). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, 46.
- Štos, J., 2019. Razvoj in validacija GC-FID/MS analiznega postopka za določitev maščobnih kislin v žiru in polhovi masti. Magistrsko delo. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 95.