



**UNIVERZITET U NIŠU**  
**PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU**

**DIJANA Z. GOLUBOVIĆ**

**Antimikrobna aktivnost komercijalnih etarskih ulja vreska, smilja i  
origana na odabrane sojeve uslovno patogenih mikroorganizama**

**MASTER RAD**

**Mentor:**

**dr Zorica Stojanović Radić**

**Kandidat:**

**Dijana Z. Golubović**

**NIŠ, 2020**



**UNIVERZITET U NIŠU**  
**PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU**

**DIJANA Z. GOLUBOVIĆ**

**Antimikrobna aktivnost komercijalnih etarskih ulja vreska, smilja i  
origana na odabrane sojeve uslovno patogenih mikroorganizama**

**MASTER RAD**

**Mentor:**

**dr Zorica Stojanović Radić**

**Kandidat:**

**Dijana Z. Golubović**

**NIŠ, 2020**



**UNIVERSITY OF NIS**  
**FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS**  
**DEPARTMENT OF BIOLOGY AND ECOLOGY**

**DIJANA Z. GOLUBOVIĆ**

**Antimicrobial activity of commercial essential oils of *Origanum vulgare* L.,  
*Calluna vulgaris* L., and *Helichrysum italicum* L.**

**Mentor:**

**PhD Zorica Stojanović Radić**

**Candidate:**

**Dijana Z. Golubović**

**NIŠ, 2020**

# SADRŽAJ

Sažetak.....	7
Abstrakt.....	8
Uvod.....	9
Osobine ispitivanih mikroorganizama .....	20
Gram-negativne bakterije: .....	20
Rod Escherichia, vrsta <i>Escherichia coli</i> ; .....	20
Rod Pseudomonas, vrsta <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; .....	21
Rod Salmonella, vrsta <i>Salmonella enterica</i> ; .....	22
Rod Enterobacter, vrsta <i>Enterobacter aerogenes</i> ; .....	22
Gram-pozitivne bakterije: .....	23
Rod Staphylococcus, vrsta <i>Staphylococcus aureus</i> ; .....	23
Rod Bacillus, vrsta <i>Bacillus cereus/subtilis</i> ;.....	23
Rod Sarcina, vrsta <i>Sarcina lutea</i> ;.....	24
Rod Candida, vrsta <i>Candida albicans</i> .....	24
Cilj rada: .....	25
Materijal i metode: .....	26
Testiranje antimikrobne aktivnosti .....	26
Mikrodiluciona metoda.....	26
Rezultati i diskusija .....	27
Tabela 1. Antimikrobna aktivnost (MIK) etarskih ulja <i>Origanum vulgare</i> , <i>Helichrysum italicum</i> i <i>Calluna vulgaris</i> na odabrane sojeve uslovno patogenih mikroorganizama.....	27
Tabela 2. Antimikrobna aktivnost (MIK) etarskog ulja <i>Calluna vulgaris</i> na sojeve uslovno patogenih mikroorganizama u poređenju sa pozitivnom kontrolom(Ciprofloksacin) .....	31
Tabela 3. Antimikrobna aktivnost (MIK) etarskog ulja <i>Helichrysum italicum</i> na sojeve uslovno patogenih mikroorganizama u poređenju sa pozitivnom kontrolom (Ciprofoksacin) .....	34
Tabela 4. Antimikrobna aktivnost (MIK) etarskog ulja <i>Origanum vulgare</i> na sojeve uslovno patogenih mikroorganizama u poređenju sa pozitivnom kontrolom (Ciprofoksacin) .....	37
Zaključak: .....	39
Literatura:.....	40

## **BIOGRAFIJA KANDIDATA**

Dijana Z. Golubović rođena je u Aleksincu 05. 10. 1994. godine. Osnovnu školu „Ivan Vušović“ završava u Ražnju nakon čega upisuje Srednju medicinsku školu „Milutin Milanković“ (opšti smer) u Jagodini, koju završava kao vukovac. Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Nišu, upisuje 2013. godine, gde završava osnovne studije i iste godine upisuje Master akademske studije, smer Biologija, koje završava sa prosečnom ocenom 9,38.

# Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost, u prvom redu, dugujem mentoru ovog master rada, **prof. dr Zorici Stojanović Radić**, na ukazanom znanju, strpljenju, izvanrednoj saradnji, i stručnom usmeravanju tokom godina studija i izrade ovog rada. Bez njenog poverenja sa jedne strane i potpune slobode sa druge strane, rad na ovoj temi ne bi bio tako prijatno i ispunjavajuće iskustvo.

Najsrdačnije se zahvaljujem **doktorantkinji Marini Dimitrijević**. Poštovanje za sve ono što je učinila je neizmerno. Hvala joj– za savete, sugestije, ukazano poverenje, izdvojeno vreme, spremnost na zajednički rad. Izuzetna je čast i privilegija imati takvog saputnika u čaroban svet nauke.

Hvala i svim divnim i izvanrednim ljudima koje sam srela, neposredno ali i posredno baveći se naučnim radom, profesorima od kojih sam mnogo toga korisnog naučila, onima od kojih ću tek da učim .

Hvala svima onima koji su na bilo koji način, a naročito onima koji su neiscrpnim motivacijama, dragocenim sugestijama i podstrecima uticali da ovaj master rad primi finalni oblik i formu u kojoj ga prezentujem.

Na kraju, volela bih da izrazim neizmernu zahvalnost svojim najbližima, **majci Veneri, ocu Zoranu i bratu Danijelu**. Oni su bili i ostali bezrezervna podrška i moja sigurna luka svih ovih godina. Hvala im što su me bodrili čak i onda kada izbor nije bio lak, pružali utočište u stihiji i buri, što su me ohrabrivali i podsticali da ramišljam široko, gledam daleko, delujem pravovremeno i koračam staloženo i smireno. Uvek uz mene i za mene, oni su ti koji svaki moj uspeh čine kompletnim . Bez svih vas danas ne bih bila to što jesam.

Hvala vam!

## SAŽETAK

Cilj ovog master rada je bio ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja *Origanum vulgare* L., *Calluna vulgaris* L., *Helichrysum italicum* L., u odnosu na odabrane sojeve uslovno patogenih mikroorganizama. Komercijalno dostupna etarska ulja smilja, vreska i origana testirana su mikrodilucionom metodom u odnosu na referentne sojeve i izolate odabranih vrsta rodova *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Candida*, *Sarcina*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* i *Salmonella*.

Utvrđeno je da se aktivnost smilja kreće u rasponu od 0,62-5,00 mg/ml. Etarsko ulje vreska inhibiralo je rast test mikroorganizama pri koncentracijama od 0,62-2,50 mg/ml, dok je origano bio efikasan u opsegu koncentracija 0,62-2,50 mg/ml.

**Ključne reči:** antimikrobna aktivnost, etarsko ulje, *Origanum vulgare* L., *Calluna vulgaris* L., *Helichrysum italicum* L., referentni sojevi i izolati.

## ABSTRACT

The aim of this master thesis was to investigate the antimicrobial activities of the essential oils of *Origanum vulgare* L., *Calluna vulgaris* L., and *Helichrysum italicum* L., against selected strains of conditionally pathogenic microorganisms. Commercially available essential oils of *Origanum vulgare*, *Calluna vulgaris* and *Helichrysum italicum* were tested by microdilution method against the reference strains and isolates of selected species of *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Candida*, *Sarcina*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Salmonella*.

The activity of the *Helichrysum italicum* was found to be in the range of 0.62-5.00 mg/ml. Essential oil of the *Calluna vulgaris* inhibited the growth of microorganisms at a concentration in the range from 0.62-2.50 mg/ml, while *Origanum vulgare* has been efficient at concentrations from 0.62 to 2.50 mg/ml.

**Keywords:** antimicrobial activity, essential oil, *Origanum vulgare* L., *Calluna vulgaris* L., *Helichrysum italicum* L., reference strains and isolates.



## UVOD

Tokom čitave istorije čovečanstva, etarska ulja i aromatično bilje su bili oduvek veoma cenjeni. Vekovima se od etarskih ulja prave različite infuzije i tinkture koje se i danas koriste u fitoterapiji. Neka ulja se primenjuju u veterini, zatim kao insekticidi, a koriste se i u kožarskoj industriji i industriji boja i lakova. Najveći potrošači etarskih ulja prvenstveno su parfimerijska i kozmetička industrija, kao i industrija slatkiša, alkoholnih i bezalkoholnih pica, koja upotrebljavaju a jedinjenja osvežavajućeg mirisa, poreklom od biljaka. Etarska ulja imaju značajnu ulogu u aromaterapiji, kao i u prevenciji raznih bolesti. Neka etarska ulja se upotrebljavaju kao dodaci sredstvima za dezinfekciju, zahvaljujući njihovim osobinama, kao što su: velika isparljivost, baktericidno svojstvo, prijatan miris itd. Proizvodnja i promet etarskih ulja je izuzetno značajna i organizovana delatnost, što je, između ostalog, rezultat jačanja ekološke svesti i saznanja o neželjenim posledicama upotrebe proizvoda sintetske hemije (Matović, Vulović, 2004). Ovaj rad se bavi antimikrobnom aktivnošću etarskih ulja *Origanum vulgare L.*, *Calluna vulgaris L.* i *Helichrysum italicum L.*

### *Calluna vulgaris*

Vresak (*Calluna vulgaris* (L.) Hull, sin. *Erica vulgaris* L.) je jedina vrsta roda *Calluna*, koja pripada rodu *Ericales* i familiji *Ericaceae*. Ova biljka je poreklom iz Evrope i Severne Afrike, dok u Australiji, Kanadi i u Americi postoji kao introdukovana vrsta (Ghedira & Goetz, 2013 ).

Sezona cvetanja ove biljke počinje u maju i završava se u novembru. Cvasti su veoma male, dijametra 3 do 4 mm. U okviru hemijskih komponenti zastupljenih u ovoj biljci, najbitnija su fenolna jedinjenja, kao i triterpenoidi a posebno ursulna i oleanolna kiselina (Hai et al., 2012; Garcia-Risco et al., 2014). U cvetu i lišću ekstrakata ove biljke takođe su identifikovani lupeol i friedelin (Chudzik et al., 2015). Ova biljka sadrži i značajne aminokiseline poput glutaminske i aspartanske, koje su značajne za proces neurotransmisije i strukturne su komponente albumina i globulina (Starchenko & Grytsyk, 2017). Studijom Mandim et al. (2018), kojom je ispitan hemijski sastav vreska, utvrđeno je da je nutritivni sastav cvasti dominantan u ugljenim hidratima. Nakon njih, najzastupljeniji su proteini, dok su lipidi najmanje prisutni. Od dva identifikovana šećera

(fruktoza i glukoza), glukoza je bila zastupljenija. Prisustvo organskih kiselina bilo je takvo da su identifikovane oksalna, hininska, askorbinska i limunska kiselina. Takođe je utvrđeno prisustvo 26 različitih masnih kiselina, gde su najzastupljenije bile linolenska, palmitinska i linoleinska kiselina. Ispitivanja tokoferola utvrdila su prisustvo sve četiri izoforme, od kojih je najzastupljeniji bio  $\alpha$ -tokoferol. Analiza fenolnih komponenti utvrdila je prisustvo 12 fenolnih jedinjenja sa miricetin 3-*O*-glukozidom i miricetin 3-*O*-ramnozidom kao dominantnim jedinjenjima (Mandim et al., 2018).

Ova biljna vrsta je potvrđena lekovita biljka, koja se intenzivno koristi u etnofarmakologiji i to najčešće u formi infuzije i dekokta (Escuredo et al., 2013). Takođe se koristi kao začim i obezbeđuje izuzetne medonosne osobine.

Etnofarmakološka primena ove vrste uključuje tretman ekcema, rana i akni (Neves et al., 2009), reumatoidnog bola i problema vezanih za artritis (Monschein et al., 2010). Takođe, vresak je izuzetno efikasan u tretmanu urinarnih infekcija, pri čemu dezinfikuje urinarni trakt i ispoljava blago diuretsko svojstvo (Monschein et al., 2010; Ghedira & Goetz, 2013). U okviru bioloških efekata koje ispoljava ova biljka, naučne studije na ovu temu uglavnom su izučavale različite vrste ekstrakata ove biljke. Do sada su opisane antioksidativna (Rieger et al., 2008; Filip et al., 2012), antiinflamatorna (Orhan et al., 2007; Ghareeb et al., 2014), antinociceptivna (Orhan et al., 2007), antivirusna (Garcia-Risco et al., 2014), enzim inhibitorna (Saaby et al., 2009; Ghareeb et al., 2014), citotoksična (Calliste et al., 2001; Filip et al., 2012) i antimikrobna aktivnost (Braghioli et al., 1996; Şen et Yalçın, 2010; Huttunen et al., 2012; Vučić et al., 2014; Pavlović et al., 2014; Dezmirean et al., 2015).

### Antimikrobna aktivnost *Calluna vulgaris*

Jedna od prvih istraživanja na temu antimikrobne aktivnosti ove biljke (Braghioli et al., 1996) ispitivalo je vodeni, etanolni i etarski ekstrakt koji su izolovani iz suvih nadzemnih delova *C. vulgaris*. U istom radu, aktivnost ovih ekstrakata poređena je sa čistim jedinjenjima arbutinom, hidrokinonom i ursulnom kiselinom, koja su prisutna u ovim ekstraktima kao najzastupljenije komponente. Antimikrobna aktivnost je testirana na kliničke izolate bakterija i gljiva. Rezultati su pokazali da ni etarski ni etanolni ekstrakt nisu imali nikakvu antimikrobnu aktivnost, dok je vodeni ekstrakt inhibirao rast *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*. U okviru testiranja čistih komponenti, arbutin nije pokazao nikakvu aktivnost, dok je ursulna kiselina značajno inhibirala rast *S. aureus*. Vodeni ekstrakt, koji je ujedno pokazao i najveću antimikrobnu aktivnost, imao je minimalne inhibitorne koncentracije u rasponu od 281 µg/ml do 9000 µg/ml (Braghioli et al., 1996).

Podstaknuta etnofarmakološkom primenom *C. vulgaris*, antimikrobna istraživanja ove biljke najčešće su se fokusirala na uzročnike infekcija urinarnog trakta. Različiti autori utvrdili su da ekstrakti vreska nisu imali efekat na *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* i meticilin rezistentnu *Staphylococcus aureus* (MRSA). Antimikrobna aktivnost vodenih, etanolnih i hidroetanolnih ekstrakata cvasti *C. vulgaris* ispitivani su na sedam bakterijskih sojeva i to *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* i *Candida albicans*. Ekstrakt koji je pokazao najbolju aktivnost bio je hidroetanolni ekstrakt sa MIK vrednostima koje su se kretale od 2 do 8,5 mg/ml. Sa druge strane, najniži potencijal u smislu antimikrobne aktivnosti pokazao je etanolni ekstrakt, gde su MIK vrednosti varirale od 10,8 do 43,2 mg/ml.

Vučić et al. (2014) ispitivali su *in vitro* antibakterijsku aktivnost vodenog, etanolnog i etil acetatnog ekstrakta izolovanih iz *C. vulgaris*. Ekstrakti dobijeni vodom, etanolom i etil acetatom kao rastvaračima testirani su na po deset izolata koji su pripadali trima bakterijskim vrstama (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Proteus vulgaris*). Od testiranih ekstrakata, vodeni ekstrakt pokazao najveću aktivnost, dok je etil acetatni bio najslabiji. Vodeni ekstrakt pokazao je aktivnost na sve ispitivane sojeve, uključujući svih deset sojeva svake od tri testiranih vrsta. Rezultati su pokazali najbolju aktivnost ovog ekstrakta u odnosu na sojeve vrste *Proteus vulgaris* (MIK=2,5 mg/ml na svih 10 sojeva), dok je na preostalih 20 sojeva inhibicija rasta postignuta pri koncentracijama od 10 i 20 mg/ml.

Istraživanja finskog tima (Huttunen et al., 2012) koja su vršila testiranje različitih monofloralnih medova na humane patogene, utvrdila su značajnu antimikrobnu aktivnost meda iz ove biljke. Testiranje je pokazalo da su sve testirane bakterije, uključujući *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus* i MRSA bile osjetljive na med dobijen iz vreska. Najniža koncentracija meda od 20% inhibirala je rast *S. aureus* do 60% od rasta kontrolne kulture, dok je najniži efekat od svega 10% inhibicije postignut protiv *S. pneumoniae*. Sa druge strane, više koncentracije meda (40% i 60%) pokazale su međusobno sličan efekat u odnosu na sve testirane vrste, inhibirajući 60-90% bakterijskog rasta.

Nešto kasnije istraživanje rumunskih naučnika (Dezmirean et al., 2015) takođe je potvrdilo značajan antimikrobni efekat vreskovog meda, gde je najbolja aktivnost utvrđena u odnosu na vrste *Salmonella enteritidis* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Etanolni ekstrakt izolovan iz lišća vreska sakupljanog u Srbiji, testiran je na bakterije roda *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* i *Escherichia*. Ispitivani ekstrakt bio je efikasan samo na dve Gram pozitivne vrste i to na *S. aureus* i *B. subtilis* (Pavlović et al., 2014).

U istraživanju Şen et Yalçın (2010) ispitivana je aktivnost nus-produkta destilacije (destilacione vode) etarskog ulja *C. vulgaris* u odnosu na gljive razlagače drveta, gde je utvrđeno da ova voda ispoljava inhibitorni efekat na rast micelije *Oligoporus placenta* i *Ceriporiopsis subvermisphora*.

### *Helichrysum italicum*

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, sin. *Helichrysum angustifolium*) je tipično mediteranska biljka sa aromatičnim grmom i žutim cvetovima, koja pripada redu *Asterales* i familiji *Asteraceae*. Raste na suvim liticama i peščanom tlu. Rasprostranjena je duž istočne obale i na ostrvima Jadranskog mora. Clapham et al. (1976) su podelili vrstu *Helichrysum italicum* na tri podvrste i to: *Helichrysum italicum* ssp. *italicum*, *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum* i *Helichrysum italicum* ssp. *serotinum*. Među velikim brojem fitoprodukata izolovanih iz smilja, etarsko ulje pokazuje važnu biološku ulogu. Etarsko ulje smilja ima složen hemijski sastav koji se sastoji iz monoterpena i seskviterpena. Budući da biljku karakteriše visok nivo genetskog i metaboličkog polimorfizma koji zavisi od uslova životne sredine, fenofaze uzorkovanih biljaka i geografskog porekla, mogu se očekivati različiti hemotipovi etarskih ulja dobijenih iz ove vrste (Bianchi et al., 2001; Angioni et al., 2003; Paolini et al., 2006; Matelić et al., 2008; Maksimović et al., 2013; Costa et al., 2015; Staver et al., 2018). Glavne komponente ulja smilja su  $\alpha$ -pinen (22%), neril-acetat (6%),  $\alpha$ -cedren (10%), nerol (16%),  $\alpha$ -kurkumin (10%) i geranil-acetat (36%) (Weyerstahl et al. 1986; Blažević et al. 1995). Etarsko ulje je bogato aldehydima (Usai et al. 2010) koji su odgovorni za aromu biljke, kao i *trans*-kariofilenom (Tundis et al. 2005). Smilje je poznato je po svom protivupalnom, antialergijskom i antimikrobnom delovanju. Koristi se u narodnoj medicini kao holeretik, diuretik i ekspektorans (Chinou et al. 1996). Oliva et al. (2019) analizirali su uzorke etarkog ulja smilja gasnom hromatografijom i masenom spektrometrijom, pri čemu su analizirane i tečna i gasovita faza. Rezultati dobijeni iz analize tečne faze pokazali su da u njoj dominiraju seskviterpeni i to  $\beta$ -eudezmen (21.65%) i  $\beta$ -bisabolen (19.90%). Monoterpenska frakcija je sadržala najviše  $\alpha$ -pinena (17%) i neril acetata (10%). Sa druge strane, u gasnoj fazi najzastupljenije jedinjenje bilo je  $\alpha$ -pinen (78%). Studija Ninčević et al. (2019) uključuje taksonomiju *Helichrysum italicum*, detaljan opis morfoloških karakteristika, upotrebu, hemijsku raznolikost, kao i biološku aktivnost. Većina naučnih podataka sadržanih u ovom radu fokusirana je na hemijski sastav etarskog ulja. Ispitan je i fitoremedijacioni efekat i pokazana je njegova sposobnost da apsorbuje teške metale.

Etnofarmakološka studija u različitim regionima Evrope je pokazala da se *Helichrysum italicum* koristi kao lek za mnoge bolesti (Vieges et al., 2014) uključujući antimikrobno, antivirusno i antiproliferativno dejstvo (Rosa et al. 2007; Sala et al., 2013).

### Antimikrobna aktivnost *Helichrysum italicum*

U istraživanju Chinou et al. (1996) ispitivan je hemijski sastav etarskih ulja *Helichrysum italicum ssp. italicum* i *Helichrysum italicum ssp. amorginum* dobijenih iz cvasti biljaka, pri čemu je korišćena metoda gasne hromatografije/masene spektrometrije (GS/MS). Od 25 identifikovanih komponenti u ovoj studiji, 89,98% i 82,06% činili su geraniol (35,59%), geranil-acetat (14,69%) i nerolidol (11,86%) kao glavne komponente. U ovom istraživanju takođe je utvrđeno da ulja pokazuju antibakterijsko delovanje na testirane bakterije, odnosno Gram-pozitivne *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228) i Gram-negativne bakterije *E. coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 227853).

Nostra et al. (2001) imali su za cilj da procene uticaj dietil etarskog ekstrakta smilja na rast *S. aureus* ATCC 6538, kao i uticaj subminimalnih inhibitornih koncentracija na njegovu produkciju stafilokoknih enzima (koagulaza, hijaluronidaza, katalaza, stafilokinaza, nukleaza, lipaza) koji se smatraju faktorima virulencije. Rezultati su pokazali da je ekstrakt *Helichrysum italicum* inhibirao rast sojeva *S. aureus*, ali i da je imao redukujući efekat na produkciju stafilokoknih enzima.

U studiji Velluti et al. (2003), cilj je bio utvrditi antimikrobni efekat etarskog ulja *Helichrysum italicum* u *in vitro* uslovima na sedam vrsta mikroorganizama, uključujući *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) određene su za etarsko ulje metodom mikrodilucije, a rezultati su pokazali da je *Bacillus subtilis* (MIK=781,25 i MBK=6250 µg/ml) bio otporniji u odnosu na ostale bakterijske vrste i da ulje pokazuje značajno antimikrobno delovanje.

U studiji Mastelić et al. (2005), cilj je bio utvrditi antimikrobno delovanje ulja i uporediti ga sa frakcijama ugljovodonika (terpenima) i terpenoidima. Ulje je frakcionisano na koloni silika gela. Jedna frakcija terpenskih ugljovodonika i jedna frakcija terpenoida su dobijene tečnom i čvrstom hromatografijom. Sastav obeju frakcija, kao i ulja testirane su kao i u prethodno pomenutim istraživanjima, GC/MS metodom. Više od 60 komponenti je izdvojeno, a 52 identifikovano. Sadržaj terpenskih ugljovodonika je bio 46,9%, a sadržaj terpenoida 43,7%. Neidentifikovana jedinjenja (9,4% etarskog ulja), (13,3 terpenoidne frakcije) su predstavljala monoterpenske estre. Rezultati su pokazali da su terpenoidna frakcija i etarsko ulje imali slabo antimikrobno delovanje na Gram-negativne sojeve (*P.*

*aeruginosa* i *E. coli*). Zabeleženo je veća redukcija rasta medicinski važnog patogena poput *S. aureus* u slučaju etarskog ulja (zona inhibicije 10 mm) i njegove terpenoidne frakcije (zona inhibicije 9 mm). Etarsko ulje inhibiralo je rast *Candida albicans* (zona inhibicije 9 mm), na koju je terpenoidna frakcija pokazala veću zonu inhibicije (10 mm). *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* su inhibirani u minimalnoj koncentraciji od 5 µg/ml etarskog ulja i njegove terpenoidne frakcije. *Escherichia coli* je inhibirana u koncentraciji od 7 µg/ml, dok *Pseudomonas* nije bio inhibiran ni jednom testiranom koncentracijom.

Prilikom istraživanja Šćepanović et al. (2019) korišćena je, kao i u gore navedenom istraživanju GC/MS metoda za ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja izolovanog iz *Helichrysum italicum*. Ulja su pretežno sačinjena od seskviterpenskih ugljovodonika (52,35%), među kojima su najzastupljeniji bili γ-kurkumin (14,11%), β-selenin (11,31%) i α-kurkumen (10,42%), ali su zastupljeni bili i i monoterpeni, poput neril acetata i α-pinena. Vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) određene su za spektar mikrobnih sojeva (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus faecalis* ATCC 19433 i *Candida albicans* ATCC 10231). Rezultati su pokazali da su najosetljivije bakterije bile *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* (MIK <1,4 µg /ml) i *B. subtilis* (MIK 1,4 µg /ml).

Glavni cilj rada Džamić et al. (2019) bio je utvrđivanje hemijskog sastava etarskog ulja iz cvasti biljke, ali i procena potencijalnih antimikrobnih i antioksidativnih aktivnosti ulja. Tehnika gasne hromatografije-plamene jonizacije (GC/FID) i gasne hromatografije-masene spektrometrije (GC/MS) otkrila je najveću količinu seskviterpenskih ugljovodonika (37,88%), sa neril-acetatom (20,44%), γ-kurkuminom (14,08%) i *trans*-α-bergamotenom (6,99%) kao glavnim komponentama. Ukupan fenolni sadržaj ispitivanih ekstrakata određen je Folin-Ciocalteu testom, a kao standard je korišćena galna kiselina. Najveća fenolna koncentracija merena je u vodenom ekstraktu. Aktivnost vezivanja slobodnih radikala uzoraka procenjena je pomoću DPHH metode. U ovom testu, vodeni ekstrakt imao je najveći antioksidativni efekat (IC=0,35 mg/ml), zatim metanolni ekstrakt, dok je etarsko ulje imalo najmanju aktivnost.

Antimikrobnim testiranjem utvrđeno je da su najosetljiviji mikroorganizmi bili *B. cereus*, i *Salmonella typhimurium*, dok je među gljivama najveću osetljivost pokazao kvasac *Candida albicans*. Rezultati su pokazali da je antimikrobno delovanje etarskih ulja i

ekstrakata pokazalo minimalne inhibitorne koncentracije za sledeće vrste u vrednostima: *S. aureus* (MIK=15 mg/ml), *Bacillus cereus* (MIK=2,50 mg/ml), *Listeria monocytogenes* (MIK=15 mg/ml), *P. aeruginosa* (MIK=1,50 mg/ml), *E. coli* (MIK=2,50 mg/ml), *S. typhimurium* (MIK=2,50 mg/ml).

Navedeni rezultati pokazuju da i ulje i ekstrakti smilja poseduju vredan biološki potencijal.



### *Origanum vulgare*

Origano (*Origanum vulgare* (L.) Hull, sin. *Origanum hirtum*) je biljka koja je široko rasprostranjena u Sredozemlju i Aziji (Yi et al. 2016). Rod *Origanum* sadrži 38 vrsta jednogodišnjeg i višegodišnjeg grmolikog bilja. Prema sadržaju etarskog ulja, vrste roda *Origanum* delimo u tri grupe:

1. Vrste siromašne etarskim uljima, sadrže manje od 0,5% ulja (*Origanum calcaratum*);
2. Vrste sa sadržajem etarskih ulja od 0,5-2% (*Origanum microphyllum*);
3. Vrste bogate etarskim uljima, sadrže više od 2% ulja (*Origanum onites*, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*).

Etarska ulja se kod biljaka roda *Origanum* nalaze u cvetovima i u listovima. Posmatrajući prinose ulja, sadržaj ulja u cvetovima je veći od onog u listovima (De Mastro, 1995). Glavni terpeni koji su identifikovani u različitim vrstama origana su: karvakrol (85,4%), timol (68%),  $\gamma$ -terpinen (33,14%), a značajni su i: *p*-cimen, terpinen-4-ol, linalol,  $\beta$ -mircen, trans-sabinen hidrat i kariofilen (Leyva-López, 2017). Karvakrol kao antibakterijski i aktivni sastojak origana pokazuje jako antiseptičko dejstvo. Deluje tako što dovodi do narušavanja membranskog potencijala, što posledično dovodi do oštećenja respiratornog lanca bakterijskih ćelija i sprečava njihovo disanje, zbog čega dolazi do smrti bakterija. Glavni metabolički put je esterifikacija fenolne grupe sa sumpornom i glukuronskom kiselinom. Što je veći procenat karvakrola u ulju origana, ulje je efikasnije u smislu antimikrobne aktivnosti. Karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) i timol (2-izopropil-5-metilfenol) su izomeri i predstavljaju monoterpenske fenole (Hammer & Carson, 2011). Mogu se dobiti ekstrakcijom iz biljnih droga i sintetskim putem. Timol je kao i karvakrol odgovoran za antiseptičnost etarskog ulja origana (Wichtl, 2002; Kovačević, 2004).

Dve najpoznatije vrste roda *Origanum* su: *Origanum vulgare* subsp. *onites* L. - grčki origano i *Origanum onites* L. - turski origano. Obe vrste imaju sadržaj etarskog ulja iznad 2% (ml/100 g) suve materije. Biološka aktivnost origana uključuje širok spektar efekata počev od antibakterijskog, antifungalnog, antiviralnog i antioksidativnog, ali poseduje i sedativno dejstvo. Uz navedene efekte, origano je i sekretolik, karminativ, digestiv, analgetik, antireumatik, antispazmolitik, antitoksik, diuretik, ekspektorans i rubefacijens. Etarsko ulje origana se upotrebljava u lečenju reumatizma (Popović et al., 2010)

## Antimikrobna aktivnost *Origanum vulgare*

Istraživanje Farag et al. (1989) testiralo je efekat etarskog ulja origana (dobijeno hidrodestilacijom) na inhibiciju rasta različitih vrsta mikroorganizama. *In vitro* antimikrobna aktivnost testirana je tehnikom mikrodilucije i to na patogene sojeve vrsta *Escherichia coli* RSKK 340, *Klebsiella pneumoniae* RSKK 06017, *Pseudomonas aeruginosa* RSKK 06021, *Salmonella enteritidis* RSKK 96046, *Streptococcus pyogenes* RSKK 413/214, *Bacillus cereus* RSKK 1122, *Staphylococcus aureus* RSKK 96090 i *Micrococcus luteus*. Testirane koncentracije bile su u rasponu od 256,128 do 0,5 µg/ml, dok je rast meren spektrofotometrijski na 620 nm pomoću čitača mikroploča. Rezultati su pokazali da je etarsko ulje inhibiralo rast svih ispitivanih, gore navedenih bakterija, pri čemu su *Bacillus cereus* (32 µg/ml) i *Micrococcus luteus* (16 µg/ml) bile najosetljivije na etarsko ulje origana. Ostale su imale delimičnu otpornost, odnosno Gram-pozitivne bakterije su bile osetljivije na antimikrobno delovanje u odnosu na Gram-negativne. Utvrđena je i veza između hemijskih struktura najzastupljenijih jedinjenja kao što su timol i karvakrol u etarskom ulju i njihovog antimikrobnog delovanja.

Özkalp et al. (2010) su istraživali antimikrobnu aktivnost biljnih etarskih ulja među kojima je testiran i origano u odnosu na širok spektar mikroorganizama, uključujući patogene iz hrane (Conner et al., 1993; Srinivasan et al., 2001; Özcan et al., 2001; Friedman et al., 2002; Erkmen et al., 2004; Biavati et al., 2004).

U studiji Marques et al. (2015) zamisao je bila da se *in vitro* proceni antimikrobna aktivnost origana (*Origanum vulgare*) i majorana (*Origanum majorana*) na bakteriju *S. aureus*, izolovane iz mesa živine i da se izvrši molekularna i fenotipska karakterizacija. Svi izolati *S. aureus* testirani su na prisustvo gena koji kodiraju stafilokokne enterotoksine (gen za enterotoksin A (*sea*) i gen za enterotoksin B (*seb*)). Antimikrobna aktivnost je testirana disk-difuzijom, dok su metodom mikrodilucije određene MIK i MBK. Antimikrobna aktivnost određena *in vitro* testovima pokazala je da etarsko ulje *Origanum vulgare* na *S. aureus* izolovanog iz mesa živine deluje antimikrobno, sa MIK vrednostima u rasponu od 6,25 µl/ml do 25 µl/ml.

Istraživanje Boughendjioua et al. (2017) je sprovedeno tokom cvetanja biljke kako bi utvrdili sadržaj etarskog ulja iz uzoraka cvasti biljke. Hemijska analiza (GC/MS) etarskog ulja izvedena je na TRACE GC ULTRA opremljenoj kapilarnoj koloni VB5 (5% fenil i 95% metilpolisiloksan), spojenom sa masenim spektrometrom. Ispitivani sojevi su bili izolovani iz kliničkih uzoraka. Testovi su izvedeni na pet sojeva roda *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens* FZB42, *B. amyloliquefaciens* S499, *B. subtilis* ATCC 21332, *B. licheniformis* ATCC 14580 i *B. pumilus*. Hemijskom analizom etarskog ulja identifikovano je 25 komponenti, uglavnom fenola i terpena, a dominantna jedinjenja bili su *p*-cimen (24,01%), karvakrol (21,31%),  $\gamma$ -terpinen (9,5%) i  $\alpha$ -terpineol (3,4%). Pet sojeva pokazalo je visoku osetljivost prema etarskom ulju sa prečnicima inhibicije od 21,5 mm do 41 mm i MIK od 0,4 mg/ml.

## **Osobine ispitivanih mikroorganizama**

Mikroorganizmi su kosmopolitski organizmi, koji mogu biti sitniji od 0,1 mm, mikroskopskih veličina. Oni se ne mogu videti golim okom, ali obuhvataju i organizme koji dostižu makroskopske razmere koji se mogu videti golim okom. Mikroorganizmi obuhvataju: viruse, bakterije, alge, gljive, lišaje i protozoe (Petrović et al., 2007). Najveći broj bakterija obrazuje jedna ćelija, međutim ima i bakterija koje predstavljaju končaste ili grozdaste skupine velikog broja ćelija - kolonije. Bakterije naseljavaju sva raspoloživa staništa, zahvaljujući pre svega ogromnoj metaboličkoj aktivnosti (Petrović et al. 2007). Uslovno patogene bakterije ili oportunisti u normalnim okolnostima ne izazivaju bolesti, već samo kada se za to stvore posebni uslovi. Većina bakterijskih vrsta je apatogena, tj. ne izaziva patološke procese (Švabić-Vlahović, 2005). Prema sastavu ćelijskog zida i bojenja po Gram-u bakterije se dele na: Gram-pozitivne i Gram -negativne bakterije. Gram -pozitivne i Gram -negativne bakterije razlikuju se, osim po sastavu ćelijskog zida i prema: osetljivosti na antibiotike, količini lipida u ćelijskom zidu, zahtevima za hranljivim materijama i dr. (Mihajilov-Krstev, 2008).

### **Gram-negativne bakterije:**

#### **Rod *Escherichia*, vrsta *Escherichia coli*;**

Bakteriju *Escherichia coli* je otkrio i opisao nemačko-austrijski pedijatar Theobald Escherich 1885, po kojem je i dobila ime (Chen i Frankel, 2005). Pripada porodici Enterobacteriaceae, koja obuhvata gram-negativne štapićaste pokretne ili nepokretne forme, fakultativne anaerobe, koji u anaerobnim uslovima fermentiraju šećere do različitih krajnjih produkata. To su pravi štapići, prečnika 1-1,5 µm, dužine 2-4 µm. Raspoređeni su pojedinačno ili u nepravilnim skupinama. *Escherichia coli* je najvažniji pripadnik normalne rezidualne crevne flore čoveka i životinja (Švabić-Vlahović, 2005). U aerobnim uslovima se kao supstrat za dobijanje energije u procesu disanja koriste amino i masne kiseline, kao i šećeri. Stanovnik je gastro-intestinalnog trakta čoveka gde je deo normalne flore creva u kojima je dominantna vrsta. Zajedno sa srodnim bakterijama čini 0,1% crevne flore (Eckburg et al. 2005). *E. coli* ima vrlo kompleksnu antigensku građu jer poseduje veliki broj O, H i K antigena. Na osnovu "O" antigena ešerihije se dele u serogrupe, a na osnovu "H" antigena u serotipove (Švabić-Vlahović, 2005). Kod ljudi, *E. coli* kao dominantni fakultativni anaerob crevne flore, najčešće kolonizuje gastrointestinalni trakt gde u većini slučajeva ostaje u lumenu creva ne dovodeći do bilo kakvih negativnih promena. Ipak, kod oslabljenog ili imunosuprimiranog domaćina ili pri povredi crevnih barijera, čak i uobičajeni nepatogeni sojevi ešerihije mogu izazvati infekciju. Neki od visoko adaptiranih sojeva *E. coli* su razvili sposobnost da uzrokuju širok spektar oboljenja i kod zdravih, imunološki jakih ljudi.

Infekcije uzrokovane patogenom *E. coli* mogu biti ograničene na mukozne površine ili se mogu proširiti po celom telu (Sussman, 1997). Kao rezultat infekcije inherentno patogenom ešerihijom, javljaju se tri opšta klinička sindroma: infekcija urinarnog trakta, sepsa/meningitis i enterične/dijarealne bolesti (Nataro i Kaper, 1998). Postoji više sojeva *Escherichia coli*, koji su retko patogeni, obično u uslovima smanjene otpornosti organizma čoveka. Podela patogenih sojeva *Escherichia coli* je u pet grupa: EPEC - enteropatogene; EHEC - enterohemoragične; UPEC - uropatogene; ETEC - enterotoksične i EAEC - enteroagregativne (Georgiades et al., 2011). Nekoliko patogenih sojeva ešerihije, povezanih sa dijarealnim oboljenjima, predstavlja globalan problem javnog zdravstva, sa preko 2 miliona smrtnih ishoda kod ljudi godišnje (Chen i Frankel, 2005), posebno dece starosti od 6 meseci do 12 godina u zemljama u razvoju (Komolafe et al., 2013). Bakterijska infekcija uzrokovana inokulacijom *Escherichia coli* dovodi do ozbiljnih patoloških procesa u organizmu poput sepe i meningitisa u neonatalnom periodu (Korhonen et al., 1985), te raznih sistemskih infekcija kao što su infekcija urinarnog trakta i kolonizacija gastrointestinalnog trakta (Sarff et al., 1975; Plos et al., 1995; Karch et al., 2005).

#### **Rod *Pseudomonas*, vrsta *Pseudomonas aeruginosa*;**

Gram-negativni štapići, nemaju kapsulu i ne stvaraju spore, poseduju fimbrije. Veoma je otporna bakterija i uzročnik je brojnih infekcija. Može da kolonizuje digestivni trakt ili druge regione kao oportunist. Živi u prirodi, najčešće u površinskim vodama i zemljištu. Koristi različite izvore ugljenika i energije, raste u aerobnim uslovima i na promenljivim temperaturama. Na krvnom agaru izaziva  $\beta$ -hemolizu (Švabić-Vlahović, 2005)

**Rod Salmonella, vrsta *Salmonella enterica*;**

Rod Salmonella pripada porodici Enterobacteriaceae. Članovi ovog roda su Gram-negativni, fakultativno anaerobni bacili koji ne formiraju spore. Većina poseduje peritrihijalne flagele tj. imaju sposobnost aktivnog kretanja (Adams & Moss, 2008), izuzev *Salmonella pullorum* i *Salmonella galinarum*. Danas je prihvaćeno da se rod Salmonella sastoji iz dve vrste: *Salmonella enterica* i *S. bongori*, (Forshell & Wierup, 2006). Uglavnom se prenosi konzumiranjem kontaminiranog živinskog mesa, zaražene vode ili konzumacijom sirovih ili delimično kuvanih jaja (Wisner et al., 2010). Čest je uzročnik alimentarnih toksikoinfekcija u različitim delovima sveta čijem širenju doprinose globalizacija saobraćaja, trgovine i drugih društveno-ekoloških procesa. *S. enteritidis*, kao i drugi serotipovi salmonela, ima plazmid virulencije koji joj omogućava da opstane i da se održava unutar retikuloendotelnih ćelija, za razliku od sojeva bez plazmida koji se brzo eliminišu (Miljković-Selimović et al., 2010). U ljudskom domaćinu kolonizuje tanko crevo i najčešće dovodi do lokalnog gastroenteritisa (enterokolitisa) nego do sistemskih oboljenja. To je bio glavni uzročnik bolesti izazvane hranom u Urugvaju tokom 1990-ih, sa izraženim periodom epidemije između 1995. i 2004. godine, a slična se situacija desila u SAD-u i Evropi deceniju ranije (Yin et al., 2010).

**Rod Enterobacter, vrsta *Enterobacter aerogenes*;**

*Enterobacter aerogenes* je široko rasprostranjen u prirodi. Nalazi se u zemlji, vodi, otpadnim vodama, na biljkama i u intestinalnom traktu ljudi i životinja. Izaziva oportunističke infekcije. *E. aerogenes* javlja se kao uzročnik infekcija respiratornog i urinarnog trakta, opekotina i rana, ponekad meningitisa i sepse (Švabić-Vlahović, 2005).

## **Gram-pozitivne bakterije:**

### **Rod *Staphylococcus*, vrsta *Staphylococcus aureus*;**

*Staphylococcus aureus* je dobio ime po karakterističnom pigmentu koji kolonijama ove bakterije daje zlatnožutu boju. To je Gram-pozitivna bakterija loptastog oblika, najčešće raspoređena u vidu grozdastih formacija. *S. aureus* je jedina vrsta stafilokoka koja produkuje koagulazu. Izuzetno je otporna, može dugo da opstane van tela domaćina i široko je rasprostranjena u prirodi.

U stanju je da izazove oboljenja gotovo svih organa u i tkiva čovečjeg organizma. Produkuje beta-laktamaze i druge mehanizme rezistencije na antibiotike. Najznačajnije morfološke karakteristike *S. aureus* su: ćelijski zid, peptidoglikan, protein A, teihonska kiselina i clamping faktor. Određeni sojevi *S. aureus* sintetišu egzotoksine koji se označavaju velikim latiničnim slovima: A, B, C, D i E. Određeni procenat sojeva produkuje eksfolijatin ili epodermolitički toksin (tipovi: A i B). *S. aureus* ima sposobnost produkcije i pet različitih citotoksina:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  i leukocidin (Švabić-Vlahović, 2005). *Staphylococcus aureus* se dovodi u vezu sa nekoliko patoloških stanja kao što su angularni stomatitis, parotitis i stafilokokni mukozitis (Smith et al., 2003).

### **Rod *Bacillus*, vrsta *Bacillus cereus/subtilis*;**

Rod *Bacillus* predstavlja Gram-pozitivne, sporogene bakterije, čija DNK sadrži lance G+C (Guanin+Citozin), u procentu od 37% i pripada phylum-u Firmicutes (Holt et al., 1994). Prvi put rod *Bacillus* je opisan 1872. godine od strane Ferdinanda Kohna. Prvi put kao izazivač trovanja *B. cereus* je dokazan 1950. godine kao uzročnik bolesti nastale nakon unosa hrane, jer je potvrđeno da je sos od vanile bio zagađen, što je rezultiralo dijarejom. 1971. godine utvrđeno je da je kod osoba koje su konzumirale kuvani pirinač u kineskim restoranima, došlo do gastrointestinalnih tegoba i da je uzročnik *B. cereus* koji luči termostabilni emetični toksin (Mortimer i McCann, 1974). Vrste koje pripadaju rodu *Bacillus* su aerobni i fakultativno anaerobni, Gram-pozitivni, sporogeni štapići. Rasprostranjeni su u širokom spektru staništa: zemlji, vodi, vazduhu, hrani, kao i u fekalijama ljudi i životinja (Beattie i Villiams, 2000). Pod mikroskopom ćelije su štapićaste, prave, u prečniku obično 0,5-2,5  $\mu\text{m}$  i u dužini 1,2-10  $\mu\text{m}$ , često raspoređene u parovima ili lancima (Holt et al. 1994). Ćelije se boje Gram-pozitivno, s tim što se starije kulture teže boje ljubičasto (Varnam i Evans, 1991). *Bacillus cereus* je izolovan iz praktično svih nesterilnih uzoraka hrane (Kolstø et al., 2002; Granum, 2007), a ispitivano je i nekoliko različitih staništa na prisustvo tj. produkciju toksina. Tom prilikom konstantovano je da samo nekoliko sojeva *B. cereus* produkuju ovaj toksin (Jääskeläinen, 2008).

**Rod Sarcina, vrsta *Sarcina lutea*;**

Ćelije roda *Sarcina* su Gram pozitivne i sferične, prečnika 1,8-3 μm. Nastaju u kuboidnim paketima, ima ih osam ili više, deobna ravan ide u tri pravca. Anaerobne su. Hemoorganotropni mikroorganizmi, koji zahtevaju nutritivski bogate medijume sa ugljenim hidratima. Metabolizam je fermentativan pri čemu su ugljeni hidrati supstrati iz kojih se proizvode sirćetna kiselina, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> i druga jedinjenja. Optimalna temperatura je 30°C do 37°C. Izolovani su iz intestinalnog trakta sisara i iz semena žitarica (Bergey et al., 1974).

**Rod Candida, vrsta *Candida albicans***

*Candida albicans* je najčešća vrsta roda *Candida* izolovanih kod zdravih i bolesnih individua (60-80% slučajeva), (Silva-Rocha et al., 2014) i može se naći u kvasolikom obliku kao izdužene elipsoidne ćelije (pesudohife) i u vidu prave hife sa paralelnim zidovima koje zajedno predstavljaju micelijsku formu (Jacobsen et al., 2012). Prelaz iz kvasolike u micelijsku formu (poznat kao dimorfizam) i obrnuto, je regulisan kompleksnom mrežom puteva i prenosom signala, kao odgovor na stimuluse iz životne sredine. Opšte prihvaćena činjenica je da je micelijska forma invazivna, što je prikazano na većini histoloških preparata. S druge strane, retki su izveštaji o invaziji kvasolikih ćelija. Dimorfizam je od suštinskog značaja za formiranje biofilma sa drugim vrstama mikroorganizama koji je veoma otporan na tretman antimikrobnim agensima (Molero et al., 1998).



**Cilj rada:**

- Testirati antimikrobnu aktivnost komercijalnih etarskih ulja vrsta *Origanum vulgare*, *Helichrysum italicum* i *Calluna vulgaris*, metodom mikrodilucije.
- Utvrditi najaktivnije od testiranih ulja
- Utvrditi najosetljivije bakterijske vrste
- Predložiti najbolji način upotrebe svakog od ovih ulja u prevenciji i/ili tretmanu infektivnih oboljenja

## **Materijal i metode:**

### **Etarska ulja**

Etarska ulja su kupljena kao finalni produkt u lokalnoj biljnoj apoteci. Prema podacima proizvođača (Semperviva Oils), ulja su dobijena destilacionim procesom iz svežeg biljnog materijala.

## **Testiranje antimikrobne aktivnosti**

### **Bakterijske kulture**

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćeni su sojevi iz ATCC kolekcije (American Type Culture Collection), Gram (+) bakterije: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* 852, *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* (izolat), *Sarcina lutea* (izolat) i Gram (-) bakterije: *Escherichia coli* ATCC 9863, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enterica* ATCC 13078, *Enterobacter aerogenes* (izolat) i diploidna gljiva *Candida albicans* ATCC 10023.

### **Mikrodiluciona metoda**

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja *Origanum vulgare*, *Helichrysum italicum* i *Calluna vulgaris* testirana su mikrodilucionom metodom. Od prekonoćnih kultura testiranih sojeva mikroorganizama uzgajanih na hranljivom agaru napravljene su suspenzije bakterija u sterilnom fiziološkom rastvoru koje su podešene na turbiditet od 0.5 Mc Farland-a, koji odgovara koncentraciji bakterija  $1-5 \times 10^8$  CFU/ml (CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

Rastvori etarskih ulja (100% DMSO) ubačeni su u bunarčiće mikrotitar ploče i napravljena serija od 10 duplih razblaženja (finalni raspon koncentracija iznosio je 0,015-10 mg/ml) nakon čega je svaki bunarčić prethodno podešenom suspenzijom odgovarajuće vrste bakterije inokulisan. Na ovaj način pripremljene mikrotitar ploče inkubirane su na 37 °C u trajanju od 24 h. Zatim su očitavane minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) nakon 1 h inkubacije na 37 °C sa dodatkom 0,005% TTC-a (trifenil-tetrazolijum hlorid).

Koncentracija prvog bunarčića u kojoj nije bilo crvenog obojenja predstavlja MIK. Metoda mikrodilucije je izvedena u tri ponavljanja, a kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik Ciprofoksacin početne koncentracije 0,15 mg/ml.

## Rezultati i diskusija

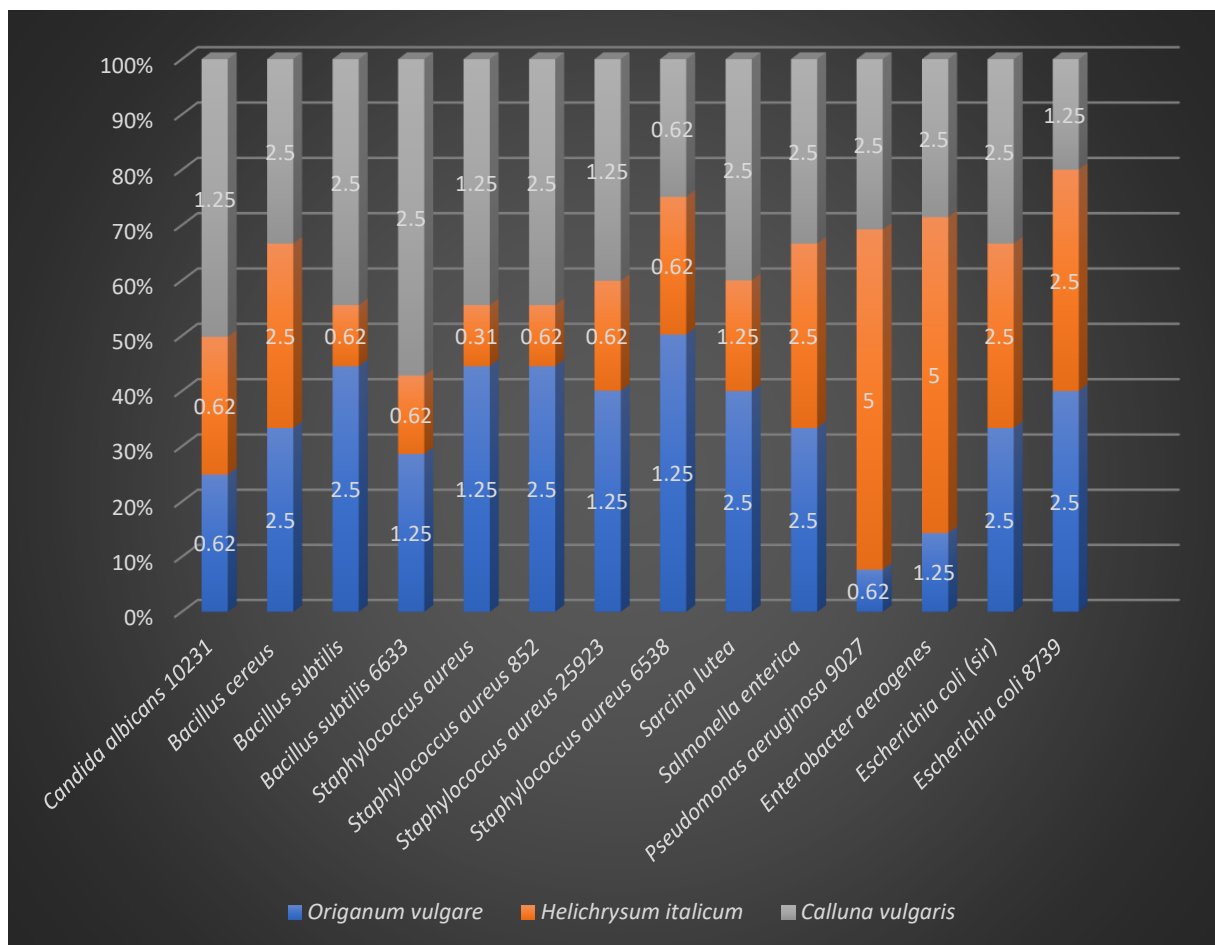
U ovom radu vršeno je ispitivanje aktivnosti etarskih ulja *Origanum vulgare* (origano), *Helichrysum italicum* (smilje) i *Calluna vulgaris* (vresak) u odnosu na odabrane sojeve mikroorganizama (Tabela 1, Grafik 1).

**Tabela 1.** Antimikrobna aktivnost (MIK) etarskih ulja *Origanum vulgare*, *Helichrysum italicum* i *Calluna vulgaris* na odabrane sojeve uslovno patogenih mikroorganizama

Sojevi uslovno patogenih MO		MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE			Srednja vrednost (SV) MIK
		<i>Origanum vulgare</i>	<i>Helichrysum italicum</i>	<i>Calluna vulgaris</i>	
<b>Gram negativne bakterije</b>					
1	<i>Escherichia coli</i> 8739	2,50	2,50	1,25	3,12
2	<i>Escherichia coli</i> (sir)	2,50	2,50	2,50	3,75
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,25	5,00	2,50	4,38
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	<b>0,62</b>	5,00	2,50	4,06
5	<i>Salmonella enterica</i>	2,50	2,50	2,50	3,75
<b>Gram pozitivne bakterije</b>					
6	<i>Sarcina lutea</i>	2,50	1,25	2,50	3,12
7	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	1,25	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	1,24
8	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	1,25	<b>0,62</b>	1,25	1,56
9	<i>Staphylococcus aureus</i> 852	2,50	<b>0,62</b>	2,50	2,81
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25	<b>0,31</b>	1,25	1,40
11	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	1,25	<b>0,62</b>	2,50	2,19
12	<i>Bacillus subtilis</i>	2,50	<b>0,62</b>	2,50	2,81
13	<i>Bacillus cereus</i>	2,50	2,50	2,50	3,75
14	<i>Candida albicans</i> 10231	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	1,25	1,25
	Srednja vrednost (SV) MIK	3,33	3,37	3,75	5,2

Mikrodilucionom metodom određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Ova metoda, korišćena u ovom istraživanju, pokazala je aktivnost etarskih ulja u opsegu koncentracija od 0,31 mg/ml do 5 mg/ml (**Tabela 1, Grafik 1**). Sva ispitivana ulja ispoljila su antimikrobni efekat na sve testirane sojeve. Pri tome, može se jasno uočiti obrazac veće aktivnosti ulja u odnosu na Gram pozitivne sojeve, posebno sojeve stafilokoke, koji su imali niže MIK vrednosti u poređenju sa ostalim sojevima. Ovo je posebno uočljivo u slučaju delovanja etarskog ulja smilja, koje je imalo ujedno i najbolji antimikrobni potencijal uz jako vidljiv selektivni efekat prema Gram pozitivnim sojevima. Ulje origana ispoljilo je sličan efekat na obe grupe ispitivanih bakterija, a najbolje dejstvo ovog ulja uočeno je u odnosu na kvasac *C. albicans*. Takođe, od ispitivanih bakterija, utvrđeno je da ovo ulje imalo jako dobar efekat na soj *P. aeruginosa*, koji je bio inhibiran koncentracijom od 0,62 mg/ml. Ova Gram negativna bakterija je ujedno i drugi po osetljivosti soj na dejstvo etarskog ulja origana. Kod ostalih sojeva, ne može se uočiti bitna razlika u aktivnim koncentracijama ni prema vrstama ni prema grupama (Gram pozitivne/negativne bakterije), jer je delovalo pri koncentracijama od 1,25 i 2,5 mg/ml. Poređenjem srednjih vrednosti etarskih ulja origana i smilja može se uočiti nešto niža srednja MIK vrednost za origano, međutim kada se posmatra pojedinačni efekat na sojeve, možemo reći da je smilje ipak bilo aktivnije. Nešto veća srednja vrednost MIK ovog ulja posledica je visokih koncentracija koje su bile neophodne za inhibiciju rasta Gram negativnih bakterija *E. aerogenes* i *P. aeruginosa*, na koje je ulje origana ujedno bilo znatno aktivnije. Etarsko ulje vreska je, sa druge strane pokazalo sličnu, ali po srednjoj vrednosti, kao i pojedinačno gledanu, najslabiju antimikrobnu aktivnost. Ovo ulje imalo je efekat pri koncentracijama od 0,62 do 2.50 mg/ml, sa najboljom aktivnošću utvrđenom na referentni soj *S. aureus*.

Raspon aktivnih koncentracija dobijen u ovom istraživanju za sva tri etarska ulja i koji se kreće od 0,31-5,00 mg/ml je uporediv u poređenju sa prethodnim istraživanjima, čije su se aktivnosti kretale u vrednostima od 0,005 mg/ml do 43,2 mg/ml: 0,28 mg/ml-9,00 mg/ml (Braghiroli et al. 1996), 2,5 mg/ml do 10 mg/ml (Vučić et al. 2014), 2-43,2 mg/ml; 0,78-6,25 mg/ml (Velluti et al. 2003), 1,4 mg/ml (Šćepanović et al. 2019), 1,50 mg/ml-15 mg/ml (Nostra et al. 2001), 1,5 mg/ml-15 mg/ml (Džamić et al. 2019), 0,016 mg/ml - 0,032 mg/ml (Farag et al. 1989), 0,0062 mg/ml - 0,1 ,mg/ml (Marques et al. 2015).



**Grafik 1.** Uporedni pregled antimikrobne aktivnosti (MIK) etarskih ulja *Origanum vulgare*, *Helichrysum italicum* i *Calluna vulgaris* na odabrane sojeve uslovno patogenih mikroorganizama

Jedini izuzetak bila je studija Mastelić et al. (2005) koji su utvrdili izuzetnu aktivnost etarskog ulja *H. italicum* i njegove terpenoidne frakcije na *S. aureus* i *C. albicans* koje su bile inhibirane pri koncentraciji od svega 0,005 mg/ml, dok je *E. coli* bila inhibirana pri koncentraciji od 0,007 mg/ml. Dobijenu aktivnost autori su pripisali terpenoidnoj frakciji ulja, ali i sinergističkom dejstvu sa manje zastupljenim komponentama. Ovde testirano ulje nije hemijski ispitivano, pa iz tog razloga nije moguće utvrditi da li razlika u aktivnosti potiče od različitih hemijskih sastava našeg i tada testiranog etarskog ulja, ali je najveća verovatnoća da je upravo to uzrok ovako velike razlike u utvrđenim aktivnostima.

Uporednim pregledom aktivnosti ispitivanih etarskih ulja može se uočiti da je na sojeve *S. aureus* najveću aktivnost pokazalo etarsko ulje smilja, dok su ostala dva etarska ulja uglavnom imala istu MIK vrednost (Grafik 1). Isto ulje je, za razliku od efekta na Gram pozitivne vrste, imalo najmanji efekat na *E. aerogenes* i *P. aeruginosa*. Takođe, može se uočiti da su sva tri ulja imala identičan efekat na vrste *S. enterica* i *E. coli* pri koncentraciji od 2,5 mg/ml.

U Tabeli 2. prikazane su vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija vreska u poređenju sa pozitivnom kontrolom, antibiotikom ciprofloksacinom. Kao što je i očekivano, antibiotik je pokazao višestruko jaču efikasnost u odnosu na etarska ulja. Ista situacija se može videti na Tabelama 3 i 4, koje prikazuju isti uporedni pregled za etarska ulja smilja i origana.

Etarsko ulje vreska bilo je efikasno u smislu inhibicije rasta bakterija i kvasca pri koncentracijama od 0,62-2,50 mg/ml. Najveću osetljivost na dejstvo ulja pokazali su sojevi vrste **(Tabela 2.)** *Staphylococcus aureus* 6538 (0,62 mg/ml), dok su veću rezistenciju pokazali sojevi *Escherichia coli* (izolat iz hrane), *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* 6633, *Staphylococcus aureus* 852 i *Enterobacter aerogenes*, koji su imali iste vrednosti MIK (2,50 mg/ml).

**Tabela 2.** Antimikrobna aktivnost (MIK) etarskog ulja *Calluna vulgaris* na sojeve uslovno patogenih mikroorganizama u poređenju sa pozitivnom kontrolom(Ciprofloksacin)

Redni broj	Sojevi uslovno patogenih MO	MIK	Antibiotik CIP
1	<i>Escherichia coli</i> 8739	<b>1,25</b>	0,00059
2	<i>Escherichia coli</i> (sir)	2,50	0,00059
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,50	0,00059
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	2,50	0,00012
5	<i>Salmonella enterica</i>	2,50	0,00012
6	<i>Sarcina lutea</i>	2,50	0,00047
7	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	<b>0,62</b>	0,00012
8	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	<b>1,25</b>	0,00023
9	<i>Staphylococcus aureus</i> 852	2,50	0,00059
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>1,25</b>	0,00023
11	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	2,50	0,00059
12	<i>Bacillus subtilis</i>	2,50	0,00059
13	<i>Bacillus cereus</i>	2,50	0,00059
14	<i>Candida albicans</i> 10231	<b>1,25</b>	/

Dosadašnje studije na temu antimikrobne aktivnosti vreska, pokazuju da dobijene aktivnosti variraju među njima i kreću se od 0,3 mg/ml do 43,2 mg/ml (Braghiroli et al. 1996; Vučić et al. 2014; Rodrigues et al., 2018). Ujedno, treba naglasiti da su ova istraživanja rađena na ekstraktima, dok je ovo prva studija aktivnosti etarskog ulja vreska. Braghiroli et al. (1996) su ispitivali antimikrobnu aktivnost vodenog, etanolnog i etarskog ekstrakta, izolovanih iz suvih nadzemnih delova *C. vulgaris*. Aktivnost ovih ekstrakata poređena je sa čistim jedinjenjima arbutinom, hidrokinonom i ursulnom kiselinom, koja su prisutna u ovim ekstraktima kao najzastupljenije komponente. Antimikrobna aktivnost je testirana na kliničke izolate bakterija i gljiva. Rezultati su pokazali da ni etarski ni etanolni ekstrakt nisu imali nikakvu antimikrobnu aktivnost, dok je vodeni ekstrakt inhibirao rast *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*. U okviru testiranja čistih komponenti, arbutin nije pokazao nikakvu aktivnost, dok je ursulna kiselina značajno inhibirala rast *S. aureus*. Vodeni ekstrakt, koji je ujedno pokazao i najveću antimikrobnu aktivnost, imao je minimalne inhibitorne koncentracije u rasponu od 0,3 mg/ml do 9 mg/ml. Pored toga, u radu o antimikrobnoj aktivnosti vodenih, etanolnih i hidroetanolnih ekstrakata cvasti *C. vulgaris*, Rodrigues et al. (2018) su utvrdili da ekstrakti vreska nisu imali efekat na *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* i meticilin rezistentnu *Staphylococcus aureus* (MRSA). Antimikrobna aktivnost utvrđena je samo na sojeve *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus*, pri čemu je najaktivniji ekstrakt bio hidroetanolni ekstrakt sa MIK vrednostima u rasponu od 2 do 8,5 mg/ml. Sa druge strane, najniži potencijal u smislu antimikrobne aktivnosti pokazao je etanolni ekstrakt, gde su MIK vrednosti varirale od 10,8 do 43,2 mg/ml.`

Vučić et al. (2014) ispitivali su *in vitro* antibakterijsku aktivnost vodenog, etanolnog i etil acetatnog ekstrakta izolovanih iz *C. vulgaris*. Ekstrakti su testirani na po deset izolata koji su pripadali trima bakterijskim vrstama (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Proteus vulgaris*). Od testiranih ekstrakata, vodeni ekstrakt je pokazao najveću aktivnost, dok je etil acetatni bio najslabiji. Vodeni ekstrakt pokazao je aktivnost na sve ispitivane sojeve, uključujući svih deset sojeva svake od tri testiranih vrsta. Rezultati su pokazali najbolju aktivnost ovog ekstrakta u odnosu na sojeve vrste *Proteus vulgaris* (MIK=2,5 mg/ml na svih 10 sojeva), dok je na preostalim 20 sojeva inhibicija rasta postignuta pri koncentracijama od 10 i 20 mg/ml.



Poređenjem naših sa prethodnim rezultatima, može se reći da je efekat etarskog ulja u rangu vodenog ekstrakta, koji se po pravilu u svim dosadašnjim istraživanjima pokazao kao najefikasniji (MIK 0,3-9 mg/ml). Ono što je takođe pravilnost i u dosadašnjim istraživanjima i u rezultatima dobijenim u ovom istraživanju je činjenica da su stafilokoke pokazale najveću osetljivost na dejstvo metabolita vreska, ali samo u slučaju jednog referentnog soja (ATCC 6538), dok su ostali sojevi ove vrste imali nešto veću otpornost (**Tabela 2.**).

**Tabela 3.** Antimikrobna aktivnost (MIK) etarskog ulja *Helichrysum italicum* na sojeve uslovno patogenih mikroorganizama u poređenju sa pozitivnom kontrolom (Ciprofoksacin)

Redni broj	Sojevi uslovno patogenih MO	MIK	Antibiotik CIP
1	<i>Escherichia coli</i> 8739	2,50	0,00059
2	<i>Escherichia coli</i> (sir)	2,50	0,00059
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,50	0,00059
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	2,50	0,00012
5	<i>Salmonella enterica</i>	2,50	0,00012
6	<i>Sarcina lutea</i>	1,25	0,00047
7	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	<b>0,62</b>	0,00012
8	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	<b>0,62</b>	0,00023
9	<i>Staphylococcus aureus</i> 852	<b>0,62</b>	0,00059
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>0,31</b>	0,00023
11	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	<b>0,62</b>	0,00059
12	<i>Bacillus subtilis</i>	<b>0,62</b>	0,00059
13	<i>Bacillus cereus</i>	2,50	0,00059
14	<i>Candida albicans</i> 10231	<b>0,62</b>	/

Etarsko ulje smilja bilo je efikasno u smislu inhibicije rasta bakterija i kvasca pri koncentracijama od 0,31-2,50 mg/ml. Najveću osetljivost na dejstvo ulja pokazali su svi sojevi vrste *Staphylococcus aureus*, među kojima je najveću osetljivost pokazao izolat iz hrane, čiji je rast bio inhibiran pri koncentraciji od 0,31 mg/ml. Ostala tri soja zlatne stafilokoke su bila inhibirana pri duplo većoj koncentraciji, koja je ujedno bila efikasna i na oba soja *Bacillus subtilis* i kvasac *C. albicans*. Ostali sojevi bili su inhibirani pri četiri i osam puta većim koncentracijama od najniže MIK utvrđene za referentni soj zlatne stafilokoke.

Studije na temu antimikrobne aktivnosti smilja *Helichrysum italicum*, pokazale su da dobijene aktivnosti znatno variraju i kreću se od 0,001 mg/ml do 15 mg/ml (1,50-15 mg/ml (Nostra et al. 2001), 0,78-6,25 mg/ml (Velluti et al. 2003), 0,005-0,007 mg/ml (Mastelić et al. 2005), 1,4 mg/ml (Šćepanović et al. 2019), 1,5-15 mg/ml (Džamić et al. 2019)). Jedno od ranijih istraživanja (Nostra et al., 2001) procenilo je uticaj dietil etarskog ekstrakta smilja na rast *S. aureus* ATCC 6538 i uticaj subminimalnih inhibitornih koncentracija na stafilokokne enzime (koagulaza, hijaluronidaza, katalaza, stafilokinaza, nukleaza, lipaza) koji se smatraju faktorima virulencije. Pokazali da je ekstrakt *Helichrysum italicum* imao inhibitorni uticaj na stafilokokne enzime i sojeve *S. aureus* smanjujući njihov rast.

Studija Velluti et al. (2003) ispitala je antimikrobni efekat etarskog ulja *Helichrysum italicum* u *in vitro* uslovima na sedam mikrobnih vrsta uključujući *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. *Bacillus subtilis* je bio otporniji (MIK=7,8 mg/ml) u odnosu na ostale bakterijske vrste. Testiranje koje su sproveli Mastelić et al. (2005) o antimikrobnoj aktivnosti ulja i koje su uporedili sa frakcijama ugljovodonika (terpena) i terpenoidima pokazalo je da su terpenoidna frakcija i etarsko ulje su imali slabo antimikrobno delovanje na Gram-negativne sojeve (*P. aeruginosa* i *E. coli*). Zabeleženo je veće smanjenje rasta medicinski važnog patogena poput *S. aureus* za etarsko ulje (zone inhibicije 10 mm) i njegovu terpenoidnu frakciju (zona inhibicije 9 mm). Etarsko ulje inhibiralo je i rast kvasca *Candida albicans* (zona inhibicije 9 mm).

U istraživanju Šćepanović et al. (2019), MIK etarskog ulja smilja određene su za mikrobne sojeve *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus faecalis* ATCC 19433 i *Candida albicans* ATCC 10231. Najosetljivije bakterije bile su *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* (MIK <1,4 µg/ml) i *B. subtilis* (MIK 1,4 µg/ml). U radu Džamić et al. (2019) antimikrobno delovanje etarskih ulja i ekstrakata pokazalo je minimalne inhibitorne koncentracije za sledeće vrste u vrednostima: *S. aureus* (MIK=15 mg/ml), *Bacillus cereus* (MIK=2,50 mg/ml), *Listeria monocytogenes* (MIK=15 mg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (MIK=1,50 mg/ml), *E.coli* (MIK=2,50 mg/ml) i *Salmonella typhimurium* (MIK=2,50 mg/ml).

**Tabela 4.** Antimikrobna aktivnost (MIK) etarskog ulja *Origanum vulgare* na sojeve uslovno patogenih mikroorganizama u poređenju sa pozitivnom kontrolom (Ciprofoksacin)

Redni broj	Sojevi uslovno patogenih MO	MIK	Antibiotik CIP
1	<i>Escherichia coli</i> 8739	2,50	0,00059
2	<i>Escherichia coli</i> (sir)	2,50	0,00059
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,25	0,00059
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	<b>0,62</b>	0,00012
5	<i>Salmonella enterica</i>	2,50	0,00012
6	<i>Sarcina lutea</i>	2,50	0,00047
7	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	1,25	0,00012
8	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	1,25	0,00023
9	<i>Staphylococcus aureus</i> 852	2,50	0,00059
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25	0,00023
11	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	1,25	0,00059
12	<i>Bacillus subtilis</i>	2,50	0,00059
13	<i>Bacillus cereus</i>	2,50	0,00059
14	<i>Candida albicans</i> 10231	<b>0,62</b>	/

Studije na temu antimikrobne aktivnosti origana *Origanum vulgare*, pokazuju da dobijene aktivnosti variraju među njima i kreću se od 0,0062 mg/ml do 0,1 mg/ml (0,016-0,032 mg/ml (Farag et al. 1989), 0,0062-0,1 mg/ml (Marques et al. 2015)).

U istraživanju Farag et al. (1989) *in vitro* antimikrobna aktivnost testirana je u odnosu na patogene sojeve *Escherichia coli* RSKK 340, *Klebsiella pneumoniae* RSKK 06017, *Pseudomonas aeruginosa* RSKK 06021, *Salmonella enteritidis* RSKK 96046, *Streptococcus pyogenes* RSKK 413/214, *Bacillus cereus* RSKK 1122, *Staphylococcus aureus* RSKK 96090, *Micrococcus luteus*. Etarsko ulje je inhibiralo rast svih ispitivanih bakterija, pri čemu su *Bacillus cereus* i *Micrococcus luteus* bile najosetljivije na etarsko ulje origana. Minimalna inhibitorna koncentracija za origano ulje protiv bakterija je varirala dok su: *Micrococcus luteus* (16 µg/ml) i *Bacillus cereus* (32 µg/ml) bile podložne organovom ulju. Ostale su imale delimičnu otpornost, odnosno Gram-pozitivne bakterije su osjetljivije na antimikrobno delovanje u odnosu na Gram-negativne.

Testiranje koje su sproveli Marques et al. (2015) procenilo je antimikrobnu aktivnost origana (*Origanum vulgare*) i majorane (*Origanum majorana*) na bakteriju *S. aureus*, izolovane iz mesa živine pri čemu su izvršili molekularnu i fenotipsku karakterizaciju. Svi izolati *S.aureus* testirani su na prisustvo gena koji kodiraju stafilokokne enterotoksine. Gen za enterotoksin A (*sea*) i gen za enterotoksin B (*seb*). Antimikrobna aktivnost određena *in vitro* testovima pokazala je da etarko ulje *Origanum vulgare* na *S. aureus* izolovanog iz mesa živine deluje antimikrobno, sa MIK vrednostima u rasponu od 6,25 µl/ml do 25 µl/ml, dok je majoran bio slabiji sa MIK vrednostima od 6,25 µl/ml do 100 µl/ml. Svi izolati uz pomoć PCR-a su identifikovani kao *S. aureus*. Od devet izolata, šest (L1, L5, L6, L8, L17, L18) je pokazalo gene koji kodiraju enterotoksin A (*sea*), dok su tri (L1, L5 i L18) imala gene koji kodiraju enterotoksin B (*seb*).

U ovom istraživanju, ulje origana je pokazalo znatno lošiji efekat nego ranija istraživanja, a imalo je aktivnost u spektru koncentracija od 0,62-2,50 mg/ml. U slučaju ovog ulja, najosetljiviji je bio Gram negativni uslovni patogen *Pseudomonas aeruginosa*, kao i kvasac *C. albicans*, dok su ostali sojevi su bili inhibirani pri duplo ili četverostruko većim koncentracijama od ove, bez nekih pravilnosti u smislu grupe/vrste.

### **Zaključak:**

1. Ispitivana etarska ulja origana, vreska i smilja imala su aktivnost u opsegu koncentracija 0,31-5 mg/ml.
2. Minimalna inhibitorna koncentracija origana je bila u opsegu koncentracija 0,62-2,5 mg/ml.
3. Minimalna inhibitorna koncentracija vreska je bila u opsegu koncentracija 0,62-2,5 mg/ml.
4. Minimalna inhibitorna koncentracija smilja je bila u opsegu koncentracija 0,31-5 mg/ml.
5. Etarsko ulje smilja pokazalo je selektivnu efikasnost usmerenu na Gram pozitivne vrste, a među njima je najosetljivija bila *S. aureus* ATCC 6538
6. Etarsko ulje origana pokazalo je značajan efekat na vrstu *P. aeruginosa*
7. Na osnovu rezultata, testirana ulja mogu se koristiti kao dodatak terapiji za lečenje stafilokoknih infekcija, dok se etarsko ulje origana može dalje ispitivati u smislu kontrole infekcija uzrokovanih pseudomonasom.

## Literatura:

Adams M.R., Moss M.O., 2000. Food Microbiology. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.161-183.

Albayrak S., Aksoy A., Sağdıç O., Budak U., 2009. Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey., 34: 463-473.

Bagambaula C. F., Uyttendaele M., Debevere J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 21: 33-42.

Barra A.A., Arlorio A., Coisson M., Russo J.D., Pirisi M.T., Satta F.M., Cabras P., 2003. Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G.Don ssp *microphyllum* (Willd) Nym. *J. Agr. Good Chem.* 51: 1030-1034.

Beattie S.H., Williams A.G., 2002. Growth and diarrhoeagenic enterotoxin formation by strains of *Bacillus cereus* in vitro in controlled fermentations and in situ in food products and a model food system. *Food Microbiology.* 19: 329-340.

Ben A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P., 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* 43: 149-154.

Bergey D.H., Buchanan R.E., Gibbons N.E.,1974. American Society for Microbiology. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins.

Bernath J., Padulosi S., 1996. *Origanum dictamnus* L. and *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* (Link) Letswaart: traditional uses and production in Greece. In: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy. 8-12.

Bermúdez-Aguirre D., Mobbs T., Barbosa-Cánovas G. V., 2011. Ultrasound applications in food processing. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*, Springer New York. 65-105.

Bianchini A., Tomi P., Costa J., Bernardini A.F.,2001. Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France) *Flavour Frag. J.* 16: 30-34.

Bigović D.J., Stević T.R., Janković T.R., Noveski N.B., Radanović D.S., Pljevljakušić D.S., Đurić Z.R., 2017. Antimicrobial activity of *Helichrysum plicatum* DC. *Hem.Ind.*, 71 (4): 337-342.

Biavati, B., Özcan, M. and Piccaglia, R. 2004. Composition and antimicrobial properties of *Satureja cuneifolia* Ten. and *Thymbra sintenesii* Bornm. Et Aznav. subsp. *isaurica* P. H. Davis Essential oils. *Annals Microbiol.* 54:393-401.

Birol Ö., Sevgi, F., Özcan M., 2010. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* l.). *J. Food Agric. Environ.* 8: (2), 272–274.



- Blažević N., Petričić J., Stanić J., Males S., 1995. *Akta Phar.*, 45: 517.
- Boughendjioua H., Seridi R., 2017. Antimicrobial Efficacy of the Essential Oil of *Origanum Vulgare* From Algeria. *J. Pharm Pharmacol Res.* 1 (1): 019-027.
- Bratta T. M., Dorman D. J. H., Deans G. S., Figueiredo C. A., Barroso G. J. and Ruberto G. 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial oils. *Flav. Fragr. J.* 13: 235-244.
- Brunelli R., Papi M., Arcovito G., Bompiani A., Castagnola M., Parasassi T., Sampaiolese B., Vincenzoni F., Spirito M.De., 2007. Globular structure of human ovulatory cervical mucus, *FASEB J.*, 21: 3872-3876.
- Calliste C.A., Trouillas P., Allais D.O., Simon A., Duroux J.L., 2001. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3321-3327.
- Chevallier A., 1996. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*, Dorling Kindersley, London.
- Chemat F., Rombaut N., Sicaire A. G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A. S., Abert-Vian M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*: 34, 540-560.
- Chen D.H., Frankel G., 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. 29: 83-98.
- Chinou I.B., Rousis V., Perdetzoglou D., Loukis A., 1996. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. *Planta Med.* 62: 377-379.
- Chinou I.B., Roussis V., Perdetzoglou D., Loukis A., 1996. *Planta Med.* 62: 377.
- Chinou I.B., Roussis V., Perdetzoglou D., Tzakou O., Loukis A., 1997. *Planta Med.* 63:181.
- Chudzik M., Korzonek-Szlacheta I., Kröl., 2015. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds, *Molecules*, 20: 1610-1625.
- Clapham A.R., 1976. *Helichrysu* Mill. In: In: Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., *Flora Europaea*. 4: 128-131.
- Clevenger J.F. Apparatus for the determination of volatile oil. 1928. *J Am Pharm Assoc* 17: 346-351
- Costa P., Loureiro J.M., Teixeira M.A., Rodrigues A.E., 2015 Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO<sub>2</sub> from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal. *Ind. Crop. Prod.* 77: 680-683.
- Conner D. E. 1993. Naturally occurring compounds. In Davidson, P. M. and Branen, A. L. (eds). *Antimicrobials in Food*. Marcel Dekker, New York, pp. 441-468

Day S.R., Moore C.M., Kundzins J.R., Sifri C.D., 2012. Community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* virulence toward *Caenorhabditis elegans* compared. *Virulence* 3: (7), 576–582.

De Lima Marques J., Volcão L.M., Funck G.D., Kroning I.S., Padilha da Silva W., Fiorentini A.M., Ribeiro G.A., 2017. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. *Industrial Crops and Products*. 77: 444-450.

De Mastro G., 1997. Crop domestication and variability within accessions of *Origanum* genus, In: Padulosi S, ed. Oregano. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996, Valenzano (Bari), Italy, Rome: IPAGRI, 34-48.

Dezmirean D., Mărghitaş L.A., Fit N., Chirilă F., Gherman B., Mărgăoan R., Aurori A., Bobiş O., 2015. Antibacterial effect of heather honey (*Calluna vulgaris*) against different microorganisms of clinical importance. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 72 (1):1-6.

Dorman H. J. D., Deans S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.

Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants antimicrobial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308-316.

Dutra T.V., Castro J.C., Lima J., Ramos T.R., Do Prado I.N., Machinski M., 2019. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. *Ind. Crops Prod.* 129: 345–349.

Dzamić A.M., Mileski K.S., Ćirić A.D., Ristić M.S., Soković M.D., Marin P.D., 2019. Essential Oil Composition, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Essential Oil and Deodorized Extracts of *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22 (2): 493-503.

Đihane B., Wafa N., Elkhamssa S., De Hero J.P., Angeles E.M., Mihoub Z.M., 2016. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25:780-787.

Eckburg P.B, Bik E.M, Bernstein C.N, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635–1638.

Escuredo O., Míguez M., González F.M., Seijo. C.M., 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area, *Food Chem.*, 138: 851-856.

Erkmen, O. and Özcan, M. 2004. Antimicrobial effects of essential oils on growth of bacteria, yeasts and molds. *J. Essent. Oil Bearing-Plant* 7:279-287

Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M. and El-Baroty, S. A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Protect.* 52:665-667.

Filip G.A., Postescu I.D., Tatomir C., Muresan A., Clichici S., 2012. *Calluna vulgaris* extract modulates NF- $\kappa$ B/ERK signaling pathway and matrix metalloproteinase expression on SKH-hairless mice skin exposed to ultraviolet irradiation. *J. Physiol. Pharmacol.*, 63:423-432.

Flannigan D. J., Suslick K. S., 2010. Inertially confined plasma in an imploding bubble. *Nature Physics*. 6(8): 598-601.

Forshell L. P., Wierup M., 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. - *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 25(2): 541- 554.

Friedman, M., Henika, P. R. and Mandrell, R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*. *J. Food Protect.* 65:1545-1560

García-Risco M.R., Vázquez E., Sheldon J., Sreinmann N., Riebesehl N., Fornari T., Reglero G., 2014. Supercritical fluid extraction of heather (*Calluna vulgaris*) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts, *Virus Res.*, 198: 9-14.

Genčić M.S., Aksić M.J., Živković M.Z., Stojanović N.M., Stojanović-Radić Z.Z., Radulović N.S., 2018. PP9 Antimicrobial and anti-inflammatory potential of different immortelle essential-oil chemotypes. *Physica, Chemistry and Technology*, 16 (1): 73.

Georgiades K., Merikangas K.R., Burstein M., Swendsen J., Avenevoli S., Case B., Heaton L., Swanson S., Olfson M., 2011. Service Utilization for Lifetime Mental Disorders in U.S. Adolescents: Results of the National Comorbidity Survey–Adolescent Supplement (NCS-A): 1: 32-45.

Gonzalez-Burgos, E.; Gomez-Serranillos. 2012. Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* 19, 5319–5341.

Ghareeb D.A., ElAhwany A.M.D., El-mallawany S.M., Saif A. A., 2014. *In vitro* screening for anti-acetylcholinesterase, anti-oxidant, anti-glucosidase, anti-inflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants. *Biotechnolog. Biotechnol. Equip.*, 28: 1155-1164

Ghedira K., Goetz. P., Bruyère C., 2013. *Calluna vulgaris* (L.) Hull ou *Calluna vulgaris* Salisb. (*Ericaceae*). *Phytotherapie*, 11: 52-55.

Granum E., Olsen J.S., Skogan G., Fykse E.M., Rawlinson E.L., Tomaso H., Blatny J.M., 2007. Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on adk-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. 71: 265-274.

Goncalves Cattelan, Marília, Bonatto, Machado de Castilhos, Maurício, Priscila, J.P.S., Leite Hoffmann, F., 2013. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. *Nutr. Food Sci.* 43: (2), 169–174

- Govaris A., Solomakos N., Pexara A., Chatzopoulou P.S., 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.* 137: (2–3), 175–180.
- Hai W., Chen H., Zhao M., Wang Y., Hong L., Tang H., Tian X., 2012. Two new cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Clematis argenticulida*, *Fitoterapia.*, 83: 759-764.
- Hammer K. A., Carson C. F. and Riley T. Y. 1999. Antimicrobial activity of essential oil and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86: 985-990.
- Hammer K. A., Carson C. F. 2011. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (ed.) *Lipids and essential oils*. New Delhi, India: John Wiley, Sons, Ltd.
- Henglein A., Kormann C., 1985. Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*: 48(2), 251-258.
- Holand TL., Arnold C., Fowler V.G., 2014. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia. A review *Jama.* 312: 1330-1341.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition, Williams and Wilkins, USA. 559-565.
- Huang B., Fettweis J.M., Brooks J.P., Jefferson K.K., Buck G.A., 2014. The changing landscape of the vaginal microbiome, *Clin. Lab. Med.*, 34: 747-761.
- Jääskeläinen E., 2008. Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food. 1-74.
- Jacobsen I.D., Wilson D., Wächtler B., Brunke S., Naglik J.R., Hube B., 2014. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 1-10.
- Jirovetz L., Eller G., Buchbauer G., Schmidt E., Denkova Z., Stoyanova A.S., Nikolova R., Geissler M., 2006. Chemical composition antimicrobial activities and other descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent and of their principal aroma compounds. *Agronomy & Horticulture.*, 2: 1-12.
- Juliano C., Marchetti M., Pisu M.L., Usai M., 2018. *In vitro* Antimicrobial Activity of Essential Oils from Sardinian Flora against *Cutibacterium* (Formerly *Propionibacterium*) acnes Its Enhancement by Chitosan. *Scientia Pharmaceutica.*, 40: 1-10.
- Juliano C., Marchetti M., Campagna P., Usai M., 2017. Antimicrobial Activity and chemical composition of essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. tyrrhenicum Bacch., Brullo & Guiso collected in South – West Sardinia. *Saudi Journal of Biological Sciences.*, 26: 897-905.
- Karch H., Tarr P.I., Bielaszewska M., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology.* 295: 405-418.
- Komolafe B.M., Ogundare A.O., Adebolu T.T., 2013. Therapeutic and Immunomodulatory Effects of Raw Maize “OGI” on Rats Infected with *Escherichia coli* 0157:H7. 6: 570-576.

Korhonen T.K., Valtonen M.V., Parkkinen J., Vaisanen-Rhen V., Finne J., Orskov F., Orskov I., Svenson S.B., Makela P.H. 1985. Serotypes, Hemolysin Production, and Receptor Recognition of *Escherichia coli* Strains Associated with Neonatal Sepsis and Meningitis. 48: 486-491.

Kovačević H. 2004. Osnove farmakognozije. Beograd: Srpska školska knjiga.

Kolstø A.B., Reiter L., Piehler A.P., 2011. Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. *Journal of Microbiological Methods*. 86: 210-217.

Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D., 2002. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol.*, 83: 73-77.

Kürkçüoğlu M., Ağalar H.G., Aksoy A., Can Başer K.H., 2018. Composition of the Essential Oils of Two Endemic *Helichrysum* species in Turkey. *Rec. Nat. Prod.*, 1-7.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91: 453-462.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: (3), 453-462.

Leyva-López N., Gutiérrez-Grijalva E.P., Vazquez-Olivo G., Basilio Heredia J., 2017. Essential oils of Oregano: Biological Activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*. 1-24.

Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., Berti L., Page's J.M., Amaral L., Bolla J.M., 2009. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2209-2211.

Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., Berti L., Pages J.M., Amaral L., Bolla J.M., 2009. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-negative species. *Antimicrob. Agents*. 53: 2209-2211.

Ma B., Forney J., Ravel J., 2012. Vaginal microbiome: rethinking health and disease, *Annu. Rev. Microbiol.*, 66: 371-389.

Machado D., Gaspar C., Palmeira-de-Oliveira A., Cavaleiro C., Salgueiro L., Martinez-de-Oliveira., Cerca N., 2017. *Thymbra capitata* essential oil as potential therapeutic agent against *Gardnerella vaginalis* biofilm-related infections, *Future Microbiol.*, 12: 407-416.

Maksimović S., Tadić V., Ivanović J., Radmanović T., Milovanović S., Stanković M., Zizović I., 2018. Utilization of the integrated process of supercritical extraction and impregnation for incorporation of *Helichrysum italicum* extract into corn starch xerogel. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 24. 191-200.

Malle'a M., J. Chevalier C., Bornet A., Eyraud A., Davin-Regli C., 1998. Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology*. 144: 3003– 3009.

Mandim F., Barros L., Calhelha. C.R., Abreu. V.M.R., Pinela J., Alves J.M., Heleno S., Santos F.P., Ferreira C.F.R.I., 2018. *Calluna vulgaris* (L.) Hull: chemical characterization, evaluation of its bioactive properties and effect on the vaginal microbiota. *Food Funct.*, 10 (1): 78-89.

Mastelic J., Politeo O., Jerković I., Radošević N., 2005. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem. Nat. Compd.* 41: 35–40.

Mastelić J., Politeo O., Jerković L., Radošević N., 2005. Composition and Antimicrobial Activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chemistry of Natural Compounds.*, 41 (1): 36-40.

Mason T.J., Peters D., 2002. Practical sonochemistry: Power ultrasound uses and applications. Woodhead Publishing.

Mihajilov – Krstev T., 2008. Radna sveska iz mikrobiologije. – Niš: Prirodno – matematički fakultet, Odsek za biologiju sa ekologijom, Niš.

Miljković-Selimović B., Babić T., Stojanović P., 2010. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *enteridis* – actualities and importance. 49(3):71-75.

Mollova S., Fidan H., Antonova D., Bozhilov D., Stanev S., Kostova I., Stoyanova A., 2018. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don species essential oils., 1-25.

Molero G., Díez-Orejas R., Navarro-García F., Monteoliva L., Pla J., Gil C., Sánchez-Pérez M., Nombela C., 1998. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Research Articles*. 1: 95-106.

Monschein M., Neira J.I., Kumert O., Bucar F., 2010. Phytochemistry of Heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.) and its altitudinal alteration. *Phytochem. Rev.*, 9: 205-215.

Mortimer P.R., Mccann G., 1974. Food-Poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *The lancet*. 303: 1043-1045.

Naim A. and Tariq P. 2006. Evaluation of antibacterial activity of decoction, infusion and essential oil of *Origanum vulgare* on methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biol. Biotech.* 3 (1): 121-125.

Nataro J.P., Kaper J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli* *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEW*: . 142–201

Neves M.J., Matos C., Moutinho C., Querioz and Goes L.R., 2009. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal), *J. Ethnopharmacol.*, 124: 270-283.

Ninčević T., Grdiša M., Šatović Z., Jug-Đujaković M., 2019. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. *Industrial Crops & Products* 138: 1-10.

Nostro A., Bisignano G., Cannatelli M.A., Crisafi G., Germano M.P., Alonzo V., 2001. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17: 517.

Nostro A., Bisignano G., Cannatelli M.A., Crisafi G., Germano M.P., Alonzo V., 2001. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 17: 517–520.

Oliva A., Garzoli S., Sabatino M., Tadić V., Costantini S., Ragno R., Božović M., 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. *Nat. Prod. Res.* 3: 1–4.

Olivia A., Garzoli S., Sabatino M., Tadić V., Costantini S., Ragno R., Božović M., 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. *Natural Product Research*, 1-4.

Orchard A., Kamatou G., Viljoen A.M., Patel N., Mawela P., Vuuren S.F., 2019. The Influence of Carrier Oils on the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Essential Oils. *Complementary and Alternative Medicine*, 1-24.

Orhan I., Küpeli E., Terzioglu S., Yesilada E., 2007. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3- $\beta$ -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial parts of *Calluna vulgaris* L., *J. Ethnopharmacol.*, 114: 32-37.

Özcan, M. and Erkmén, O. 2001. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *Eur. Food Res. Technol.* 212:658-660.

Özkalp B., Sevgi F., Özcan M., Özcan M.M., 2010. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 8 (2): 272-274.

Paolini J., Desjobert J.M., Costa J., Bernardini A.F., Castellini C.B., Cioni P.L., Flamini, G., Morelli I., 2006. Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* from Tuscan Archipelago islands. *Flavour Frag. J.* 21: 805–808.

Pavlović D., Lakušić B., Kitić D., Milutinović M., Kostić M., Miladinović B., Kovačević N., 2014. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 31 (1): 81-85.

Peruč D., Gobin I., Abram M., Broznić D., Svalina T., Štifter S., Staver M.M., Tićac B., 2018. Antimycobacterial potential of the juniper berry essential oil in tap water. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 69: 46-54.

Petrović O., Knežević P., Simeunović J., 2007. *Mikrobiologija*. – Skripta za studente, Novi Sad.

Plant J., Stephens B., 2015. Evaluation of the Antibacterial Activity of a Sizable Set of Essential Oils. *Medicinal & Aromatic Plant*, 4 (2): 1-5.

Plos K., Conelli H., Jodal H., Marklund B.I., Mårild S., Wettergren B., Svanborg C., 1995. Intestinal Carriage Of P Fimbriated Escherichia Coli And The Susceptibility To Urinary Tract Infection In Young Children. 625-631.

Popović V., Savić M., Katić B., 2010. *Origanum vulgare* L.-svojstva, proizvodnja i promet. *Original scientific articles*. 71:1-17.

Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S., 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *Research article*, (6) 39: 1-8.

Rieger G., Müller M., Guttenberger H., Bucar F., 2008. Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra* and *Vaccinium myrtillus*, *Food Chem.*, 56:9080-9086.

Rodrigues F., Moreira T., Pinto., Pimentel F.B., Costa A., Nunes M.A., Albuquerque T.G., Costa H.S., Palmeirade-Oliveira M.B., 2018. The phytochemical and bioactivity profiles of wild *Calluna vulgaris* L. flowers, *Food Res.*, 111: 724-731.

Rosa A., Deiana M., Atzeri A., Corona G., Incani A., Melis M.P., Appendino G., Dessi M.A., 2007. Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated alpha-pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chem.-Biol. Interact.* 165: 117–126.

Rossi P.G., Berti L., Panighi J., Luciani A., Maury J., Muselli A., 2007. Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. *J.Essent.Oil.Res.*, 19: 176-182.

Roussis V., Tspukatou M., Petrakis P.V., Chinou I., Skuola M., Harborne J.B., 2000. *Biochem. Syst. Ecol.*, 28,: 163.

Saaby L., Rasmussen H.B., Jäger A.K., 2009. MAO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *J. Ethnopharmacol.*, 121: 178-181.

Sala A., Recio M.D., Giner R.M., Manez S., Rios 2003. J.L., *J. Nat. Prod.*, 64: 1360.

Sani A.M., 2014. Inhibitory Effect of *Helichrysum arenarium* Essential Oil on the Growth of Food Contaminated Microorganisms. *World Academy of Science, Engineering and Tecnology Internactional Journal of Agriculture and Biosystems Engineering.*, 8 (8): 839-843.

Sarff L. D., McCracken G. H., Schiffer M. S., Glode M. P., Robbins J. G., Ørskov I., 1975. Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. 1099–1104.

Silva-Rocha W.P., Brito-Lemos V.L., Svidizisnki T.I.E., Chaves G.M., 2014. Candida species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil.1-20.

Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Food Microbiol.* 26: 118-122.



Smith J.M., Feil E.J., Cooper J.E., Grundmann H., Robinson D.A., Enright M.C., Berendt T., Peacock S.J., Murphy M., Spratt B.G., Moore C.E., Day N.P.J., 2003. How Clonal Is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology*. 185: 3307-3316.

Sobhy E.A., El-Feky S.S., 2007. Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6 (4): 692-695.

Song Z., Sun H., Yang Y., Jing H., Yang L., Tong Y., 2016. Enhanced efficacy and anti-biofilm activity of novel nanoemulsions against skin burn wound multi-drug resistant MRSA infections. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 12: 1543–1555.

Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T. and Perumalsamy, P. L. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J. Ethnopharm.*74:217-220.

Starchenko G.Y., Grytsyk A.R., 2017. Analysis of amino acid composition of *Calluna vulgaris*, L. (Hull), *Pharm. Innov. J.*, 6: 88-89.

Staver M.M., Gobin I., Ratkaj I., Petrović M., Vulinović A., Dinarina-Sablić M., Broznić M., 2018. *In vitro* antiproliferative and antimicrobial activity of the essential oil from the flowers and leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don growing in central Dalmatia (Croatia). *J. Essent. Oil Bearing Plant.* 21(1): 77-91.

Sussman M., 1997. *Escherichia coli*, Mechanisms of virulence, Department of Microbiology Max Sussman Cambridge University Press. 639.

Švabic-Vlahović M., 2005. Medicinska bakteriologija. Savremena administracija, Beograd.

Šćepanović A., Krivokapić S., Šćepanović V., Živković V., Perović S., 2019. Chemical Constituents and Biological potential of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Montenegro. *Agriculture & Forestry*, 65 (2): 53-58.

Talić S., Odak L., Bevanda A.M., Crnjac N., Paštar M., 2019. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Herzegovina: Volatile Composition, Variations during Seasons, Total Polyphenols, Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity. *Croat. Chem. Acta.*, 92 (1): 69-77.

Teissedre P. L., Waterhouse A. L. 2000. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3605-3801.

Thielmann J., Muranyi P., Kazman P., 2019. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5.

Tiwari B. K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 7: 100-109.

Toma M., Vinatoru M., Paniwnyk L., Mason T.J., (2011). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*. 8 (2): 137-142.

- Trombetta D., Saija A., Bisignano G., Arena S., Caruso S., 2002. Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant alpha, beta unsaturated aldehydes. *Lett Appl Microbiol* 35: 285-290.
- Tundis R., Statti G.A., Conforti F., Bianchi A., Agrimonti C., Sacchetti G., Muzzoli M., Baller, M., Menichini F., Poli F., 2005. Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don (Asteraceae). *Nat. Prod. Res.* 19: 379–387.
- Tzanova M., Grozeva N., Gerdzhikova M., Atanasov V., Terzieva S., Prodanova R., 2018. Biochemical composition of essential oil of Corsican *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don, introduced and cultivated in South Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.*, 24 (6): 1071-1077.
- Usai M., Foddai M., Bernardini A.F., Muselli A., Costa J., Marchetti M., 2010. Chemical composition and variation of the essential oil of wild Sardinian *Helichrysum italicum* G. Don subsp. *microphyllum* (Willd.) Nym. from vegetative period to postblooming. *J. Essent. Oil Res.* 22: 373–380.
- Uzair B., Niaz N., Bano A., Khan B.A., Zafar N., Iqbal M., 2017. Essential oils showing in vitro anti MRSA and synergistic activity with penicillin group of anti-biotics. *Pak. J. Pharm. Sci.* 30: (5), 1997–2002.
- Valachovic P., Pechov, A., Mason T.J., 2001. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry.* 8(2), 111- 117.
- Vasconcelos N.G., Croda J., Silva K.E., Leal Motta M.L., Maciel W.G., Limiere L.C., Simionatto S., 2019. *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits the growth of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* 52: 1-5.
- Varnam A.H., Evans M.G., 1991. Food poisoning: medical and microbiological overview; *Bacillus*. In foodborne pathogens, an illustrated text. Mosby year book, London, UK. 19: 267-288.
- Velluti A., Sanchis V., Ramos A. J., Ergido J. and Marin S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 145– 154.
- Viegas D.A., Palmeira-De-Oliveira A., Salgueiro L., Martinez-De-Oliveira J., Palmeira-De-Oliveira R., 2014. *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data. *J. Ethnopharmacol.* 151: 54–65.
- Vučić M.D., Petković R.M., Rodić-Grabovac B.B., Stefanović D. O., Vasić M.S., Čomić R.Lj., 2014. *In vitro* activity of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) extracts on selected urinary tract pathogens, *Bosn. J Basic Med. Sci.*, 14 (4): 234-238.

Weyerstahl P., Marschall-Weyerstahl H., Weirauch M., Meier N., Manteuffel E., Leimner J., Sholtz S., 1986. Isolation and synthesis of compounds from the essential oil of *Helichrysum italicum*. In: Brunke, E.S. (Ed.), Progress in Essential Oil Research. *Walter de Gruyter, Berlin*. 178–195.

Wichtl M. 2002. Teedrogen und Phytopharmaca. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Wisner A.L.S., Desin T. S., Koch B., Lam P.K.S., Berberov E.M., Mickael C.S., Potter A.A., Köster W., 2010. *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar *Enteritidis* *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system: role in intestinal colonization of chickens and systemic spread. 156: 2770-2781.

Yap P.S.X., Yiap B.C., Ping H.C., Lim S.H.E., 2014. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8: 6-14.

Yi Z., Quan H., Jun W., Jian P., Wei H., 2016. Oregano essential oil improves intestinal morphology and expression of tight junction proteins associated with modulation of selected intestinal bacteria and immune status in a pig model. *Biomed Res. Int.* 1-11.

Yin G.J., Lin R.T.P., Teo J.W. P., 2010. Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *Research in Microbiology*. 161: 243-248.



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, <b>РБР:</b>	
Идентификациони број, <b>ИБР:</b>	
Тип документације, <b>ТД:</b>	Монографска документација
Тип записа, <b>ТЗ:</b>	текстуални / графички штампани материјал
Врста рада, <b>ВР:</b>	Мастер рад
Аутор, <b>АУ:</b>	Дијана З. Голубовић
Ментор, <b>МН:</b>	Зорица Стојановић Радић
Наслов рада, <b>НР:</b>	Антимикробна активност комерцијалних етарских уља вреска, смиља и органа на одабране сојеве условно патогених микроорганизама
Језик публикације, <b>ЈП:</b>	Српски
Језик извода, <b>ЈИ:</b>	Енглески
Земља публикавања, <b>ЗП:</b>	Р. Србија
Уже географско подручје, <b>УГП:</b>	Р. Србија
Година, <b>ГО:</b>	2020.
Издавач, <b>ИЗ:</b>	ауторски репринт
Место и адреса, <b>МА:</b>	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, <b>ФО:</b> <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	страна (52) ; табела (4) ; графикона (1);
Научна област, <b>НО:</b>	Биологија
Научна дисциплина, <b>НД:</b>	Микробиологија
Предметна одредница/Кључне речи, <b>ПО:</b>	Антимикробна активност, етарско уље, вресак, смиље, органо, патогени микроорганизми
<b>УДК</b>	579:665.52+635.7
Чува се, <b>ЧУ:</b>	Библиотека ПМФ-а, Ниш
Важна напомена, <b>ВН:</b>	Нема

<p>Извод, <b>ИЗ:</b></p>	<p>Циљ овог мастер рада је био испитивање антимикробних активности етарских уља <i>Origanum vulgare</i> L., <i>Calluna vulgaris</i> L., <i>Helichrysum italicum</i> L., у поређењу са одабраним сојевима условно патогених микроорганизама. Комерцијално расположива етарска уља смиља, вреска и оригана тестирана су микродилуционом методом у односу на референте сојеве и изолате одабраних врста родова <i>Staphylococcus</i>, <i>Escherichia</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Candida</i>, <i>Sarcina</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Pseudomonas</i> i <i>Salmonella</i>. Утврђено је да се активност смиља креће у распону од 0,62-5,00 мг / мл. Етарско уље вреска инхибирало је раст тест микроорганизама концентрације од 0,62-2,50 мг / мл, док је оригано био ефикасан у опсегу концентрација 0,62-2,50 мг / мл.</p>
<p>Датум прихватања теме, <b>ДП:</b></p>	
<p>Датум одбране, <b>ДО:</b></p>	
<p>Чланови комисије, <b>КО:</b></p>	<p>Председник:  Члан:  Члан, ментор:</p>



# UNIVERSITY OF NIŠ-FACULTY OF SCIENCE

## KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, <b>ANO</b> :	
Identification number, <b>INO</b> :	
Document type, <b>DT</b> :	Monograph
Type of record, <b>TR</b> :	Textual / graphic printed material
Contents code, <b>CC</b> :	University degree thesis
Author, <b>AU</b> :	Dijana Z. Golubović
Mentor, <b>MN</b> :	Zorica Stojanović-Radić
Title, <b>TI</b> :	Antimicrobial activity of commercial essential oils of <i>Origanum vulgare</i> L., <i>Calluna vulgaris</i> L., and <i>Helichrysum italicum</i> L., on selected strains of conditionally pathogenic microorganisms
Language of text, <b>LT</b> :	Serbian
Language of abstract, <b>LA</b> :	English
Country of publication, <b>CP</b> :	Republic of Serbia
Locality of publication, <b>LP</b> :	Serbia
Publication year, <b>PY</b> :	2020.
Publisher, <b>PB</b> :	Author' s reprint
Publication place, <b>PP</b> :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, <b>PD</b> :	Pages (52) ; tables (4), graphics (1);
Scientific field, <b>SF</b> :	Biology
Scientific discipline, <b>SD</b> :	Microbiology
Subject/Key words, <b>SKW</b> :	Antimicrobial activity, essential oil, <i>Origanum vulgare</i> L., <i>Calluna vulgaris</i> L., <i>Helichrysum italicum</i> L., pathogenic microorganisms
<b>UC</b>	579:665.52+635.7
Holding data, <b>HD</b> :	The Library of Faculty of Sciences, University of Niš
Note, <b>N</b> :	No

Abstract, **AB:**

The aim of this master thesis was to investigate the antimicrobial activities of the essential oils of *Origanum vulgare* L., *Calluna vulgaris* L. and *Helichrysum italicum* L., against selected strains of conditionally pathogenic microorganisms. Commercially available essential oils of *Origanum vulgare*, *Calluna vulgaris* and *Helichrysum italicum* were tested by microdilution method against the reference strains and isolates of selected species of *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Candida*, *Sarcina*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Salmonella*.

The activity of the *Helichrysum italicum* was found to be in the range of 0.62-5.00 mg/ml. Essential oil of the *Calluna vulgaris* inhibited the growth of microorganisms at a concentration in the range from 0.62-2.50 mg/ml, while *Origanum vulgare* has been efficient at concentrations from 0.62 to 2.50 mg/ml.

Accepted by the Scientific Board on, **ASB:**

Defended on, **DE:**

Defended Board **DB:**

President:

Member:

Member,  
Mentor: