



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Verica Aleksić, MSc

**OSETLJIVOST MULTIPLO REZISTENTNIH SOJEVA
Acinetobacter baumannii NA NEKONVENCIONALNE
ANTIMIKROBNE AGENSE**

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Novi Sad, 2016

Zahvaljujem se svima na Prirodno-matematičkom fakultetu, Departmanu za biologiju i ekologiju i Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, koji su mi omogućili izradu ove disertacije, u okviru realizacije projekta Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije br. 172058.

Posebnu zahvalnost dugujem:

- * Mentoru prof. dr Petru Kneževiću na pruženoj prilici da se razvijam na profesionalnom planu, kao i na svemu što sam od njega naučila o mikrobiologiji, nauci, poslovnom ponašanju, ali i životnom stilu. Takođe sam mu zahvalna na prijateljskim savetima, toleranciji i podršci koju mi pruža od početka naše saradnje.
- * Članovima komisije prof. dr Nedi Mimici-Dukić, rukovodiocu projekta u okviru kojeg je rađena disertacija, prof. dr Ružici Igić i prof. dr Jeleni Knežević-Vukčević na konstruktivnim, stručnim i tehničkim savetima prilikom pisanja disertacije.
- * Od velikog značaja za izradu ovog rada bila mi je saradnja sa članovima Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda na čemu im toplo zahvaljujem. Dr Nataši Simin hvala na ekstraktima vrsta roda *Allium*, hemijskoj analizi etarskih ulja, kao i na dragocenoj pomoći u pisanju disertacije i statističkoj obradi pojedinih rezultata. Zahvaljujem dr Mariji Lesjak na etarskim uljima vrsta rodova *Juniperus*, *Eucalyptus* i *Myrtus*, dr Emiliji Svirčev na ekstraktima roda *Rumex*, kao i na pomoći u izvođenju TLC hromatografskih analiza, dr Ivani Beara na etarskim uljima biljaka porodica *Lamiaceae*, *Asteraceae* i *Apiaceae*, dr Marini Francišković na ekstraktima roda *Urtica* i dr Dejanu Orčiću na analizi hemijskog sastava etarskih ulja.
- * Dr Nataši Stanković-Nedeljković iz Zdravstvenog centra u Aleksincu zahvaljujem na ustupljenim *Acinetobacter baumannii* sojevima iz humanog patološkog materijala.
- * Prof. dr Dragani Obreht-Vidaković sa Katedre za biohemiju, molekularnu biologiju i genetiku zahvaljujem na pomoći u toku master i doktorskih studija, kao i na pomoći oko RAPD-PCR analize *A. baumannii* izolata.
- * Prof. dr Roku Kostanjšek sa Biotehničkog Univerziteta u Ljubljani dugujem zahvalnost za izuzetnu pomoć u izradi elektronskih mikrografija.
- * Prof. dr Goranu Anačkovu sa Katedre za botaniku zahvaljujem na biljnom materijalu i determinaciji biljaka, kao i na slikama biljnih vrsta roda *Allium*.
- * Članovima Katedre za mikrobiologiju, a prvenstveno prof. dr Olgi Petrović, prof. dr Draganu Radnoviću, prof. dr Maji Karaman, prof. dr Jelici Simeunović, kao i svim kolegama iz sobe 24 hvala na pozitivnoj radnoj atmosferi, pomoći, saradnji i kolegijalnosti.
- * Zaposlenima na Departmanu za biologiju i ekologiju zahvaljujem na pomoći i kolegijalnosti, a svim prijateljima na podršci i dragocenom prijateljstvu.
- * Mojoj porodici, roditeljima i sestrama, i Borisu beskrajno hvala na motivaciji, razumevanju, ljubavi i безусловnoj podršci.

Verica Aleksic

SADRŽAJ

1. UVOD.....	9
2. OPŠTI DEO.....	13
2.1. Karakteristike genomske vrste <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
2.2. Osetljivost vrste <i>A. baumannii</i> na konvencionalne antimikrobne agense.....	23
2.3. Nekonvencionalni antimikrobni agensi.....	35
2.3.1. Dosadašnja primena prirodnih antimikrobnih agenasa i njihovih biološki aktivnih komponenti.....	35
2.3.2. Biljke kao izvor antimikrobnih agenasa.....	44
2.3.2.1. Porodica Myrtaceae.....	44
2.3.2.2. Porodica Cupressaceae.....	45
2.3.2.3. Porodica Lamiaceae.....	49
2.3.2.4. Porodica Apiaceae.....	58
2.3.2.5. Porodica Asteraceae.....	60
2.3.2.6. Porodica Polygonaceae.....	62
2.3.2.7. Porodica Urticaceae.....	63
2.3.2.8. Porodica Alliaceae.....	64
2.3.3. Etarska ulja.....	68
2.3.3.1. Biološki aktivne komponente etarskih ulja.....	69
2.3.4. Biljni ekstrakti.....	71
2.3.4.1. Biološki aktivne komponente biljnih ekstrakata.....	72
2.3.5. Mehanizam delovanja nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa.....	75
2.3.6. Aktivnost nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa na <i>A. baumannii</i>	79
3. CILJ RADA.....	85
4. MATERIJAL I METODE.....	89
4.1. Formiranje kolekcije kultura okarakterisanih multiplo rezistentnih sojeva vrste <i>A. baumannii</i>	91
4.1.1. Izolacija <i>A. baumannii</i> sojeva.....	91
4.1.2. Identifikacija <i>A. baumannii</i> sojeva.....	93
4.1.3. Fenotipizacija <i>A. baumannii</i> sojeva.....	96
4.1.3.1. Osetljivost izolata na konvencionalne antimikrobne agense.....	96
4.1.3.2. Rast na različitim izvorima ugljenika.....	98
4.1.3.3. Analiza fenotipskih karakteristika važnih za proces formiranja biofilma.....	98
4.1.4. Genotipizacija <i>A. baumannii</i> sojeva.....	102
4.1.4.1. Detekcija <i>bap</i> , <i>bla_{PER-1}</i> , <i>intI1</i> i <i>intI2</i> gena.....	102
4.1.4.2. RAPD-PCR analiza.....	103

4.2. Nekonvencionalni antimikrobni agensi.....	105
4.2.1. Ekstrakcija i karakterizacija etarskih ulja.....	110
4.2.2. Karakteristike biljnih ekstrakata.....	111
4.2.3. Standardna jedinjenja.....	111
4.3. Osetljivost <i>A. baumannii</i> izolata na nekonvencionalne antimikrobne agense.....	113
4.3.1. Efekat etarskih ulja na biofilm <i>A. baumannii</i> izolata.....	114
4.3.1.1. Efekat etarskih ulja na formiranje biofilma.....	114
4.3.1.2. Efekat etarskih ulja na formirani biofilm.....	115
4.3.2. Bioautografska analiza efekta etarskih ulja i biljnih ekstrakata.....	116
4.3.3. Osetljivost <i>A. baumannii</i> na biološki aktivne komponente prirodnih antimikrobnih agenasa.....	117
4.3.4. Utvrđivanje mehanizma delovanja etarskih ulja.....	118
4.3.4.1. Skening elektronska mikroskopija <i>A. baumannii</i>	118
4.3.4.2. Tretman <i>A. baumannii</i> ćelija za utvrđivanje mehanizma delovanja etarskih ulja.....	119
4.3.4.3. Efekat etarskih ulja na oslobađanje proteina iz ćelija.....	120
4.3.4.4. Efekat etarskih ulja na proteinski profil <i>A. baumannii</i>	120
4.3.4.5. Efekat etarskih ulja na oslobađanje ugljenih hidrata iz ćelija.....	121
4.3.4.6. Efekat etarskih ulja na oslobađanje lipida iz ćelija.....	121
4.4. Efekat kombinacije antimikrobnih agenasa na <i>A. baumannii</i>	123
4.4.1. Utvrđivanje efekta kombinacije različitih tipova antimikrobnih agenasa....	123
4.4.2. Ispitivanje kinetike inhibicije rasta <i>A. baumannii</i> kombinovanjem etarskih ulja i polimiksina B.....	125
5. REZULTATI.....	127
5.1. Kolekcija <i>A. baumannii</i> izolata.....	129
5.1.1. Rezultati izolacije.....	129
5.1.2. Rezultati identifikacije.....	130
5.1.3. Rezultati fenotipizacije.....	132
5.1.3.1. Osetljivost izolata na konvencionalne antimikrobne agense.....	133
5.1.3.2. Rast na različitim izvorima ugljenika.....	137
5.1.3.3. Fenotipske karakteristike važne u procesu formiranja biofilma.....	139
5.1.4. Rezultati genotipizacije.....	144
5.1.4.1. Prisustvo <i>bap</i> , <i>bla_{PER-1}</i> , <i>intI1</i> i <i>intI2</i> gena.....	144
5.1.4.2. Rezultati RAPD-PCR analize.....	147
5.2. Nekonvencionalni antimikrobni agensi.....	150
5.2.1. Hemijski sastav etarskih ulja.....	150
5.3. Efekat nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa na <i>A. baumannii</i> izolate.....	156
5.3.1. Efekat nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa na <i>A. baumannii</i> izolate u tečnoj kulturi.....	156

5.3.2. Efekat etarskih ulja na biofilm <i>A. baumannii</i> izolata.....	168
5.3.2.1. Efekat etarskih ulja na formiranje biofilma.....	168
5.3.2.2. Efekat etarskih ulja na formirani biofilm.....	175
5.3.3. Bioautografija etarskih ulja i biljnih ekstrakata.....	182
5.3.4. Efekat biološki aktivnih komponenti nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa na <i>A. baumannii</i> izolate.....	186
5.3.5. Mehanizam delovanja etarskih ulja.....	187
5.3.5.1. Skening elektronska mikroskopija <i>A. baumannii</i> ćelija.....	187
5.3.5.2. Efekat etarskih ulja na oslobađanje proteina iz ćelija.....	189
5.3.5.3. Efekat etarskih ulja na proteinski profil <i>A. baumannii</i>	190
5.3.5.4. Efekat etarskih ulja na oslobađanje ugljenih hidrata iz ćelija.....	192
5.3.5.5. Efekat etarskih ulja na oslobađanje lipida iz ćelija.....	193
5.4. Efekat kombinacije antimikrobnih agenasa na <i>A. baumannii</i>	195
5.4.1. Efekat kombinacije različitih tipova antimikrobnih agenasa.....	195
5.4.2. Kinetika inhibicije rasta <i>A. baumannii</i> izolata kombinacijom etarskih ulja i polimiksina B.....	209
6. DISKUSIJA.....	211
6.1. Kolekcija <i>A. baumannii</i> izolata.....	213
6.2. Karakteristike <i>A. baumannii</i> izolata.....	216
6.2.1. Fenotipske karakteristike.....	216
6.2.2. Genotipske karakteristike.....	224
6.3. Nekonvencionalni antimikrobni agensi.....	231
6.3.1. Hemijski sastav etarskih ulja.....	231
6.4. Efekat nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa na <i>A. baumannii</i> izolate.....	236
6.4.1. Osetljivost <i>A. baumannii</i> izolata na etarska ulja.....	236
6.4.2. Osetljivost <i>A. baumannii</i> izolata na biljne ekstrakte.....	254
6.4.3. Efekat etarskih ulja na biofilm <i>A. baumannii</i> izolata.....	257
6.4.3.1. Efekat etarskih ulja na formiranje biofilma.....	258
6.4.3.2. Efekat etarskih ulja na formirani biofilm.....	261
6.4.4. Bioautografija etarskih ulja i biljnih ekstrakata.....	264
6.4.5. Osetljivost <i>A. baumannii</i> izolata na biološki aktivne komponente prirodnih antimikrobnih agenasa.....	267
6.4.6. Mehanizam delovanja etarskih ulja na <i>A. baumannii</i>	274
6.5. Efekat kombinacije antimikrobnih agenasa na <i>A. baumannii</i>	278
7. ZAKLJUČAK.....	287
8. LITERATURA.....	295
9. PRILOZI.....	331

1. UVOD

Borba ljudi sa velikim brojem raznovrsnih patogenih bakterija, uzročnika različitih oboljenja i infekcija traje već vekovima. Danas, jedan od najznačajnijih izazova za ljudsko zdravlje predstavlja pojava i širenje rezistencije bakterija na antimikrobne agense. Bakterije rezistentne ne samo na jedan, već istovremeno na više lekova se nekontrolisano šire zbog nepravilne i prekomerne upotrebe antibiotika. Antibiotička rezistencija može dovesti do neuspešnosti lečenja, povećanih troškova lečenja, povećane stope smrtnosti, kao i drugih ozbiljnih problema koji uključuju i globalno širenje infekcije, prenošenje rezistencije među bakterijskim sojevima, itd. Jedna od najčešće detektovanih multiplo rezistentnih bakterija je genomski vrsta *Acinetobacter baumannii* čije je progresivno povećanje rezistencije primećeno još 80-ih godina prošlog veka (Duval i sar., 1982). Ova vrsta je u XXI veku postala posebno značajna, kao jedan od važnih nozokomijalnih patogena u jedinicama intenzivne nege, a poseduje osobine zbog kojih može razviti veoma visok stepen rezistencije na konvencionalne antibiotike, zbog čega je njena eradikacija izuzetno teška. *A. baumannii* je oportunistički humani patogen, uzročnik velikog broja različitih tipova infekcija, prvenstveno kod imunokompromitovanih i imunonekompetentnih pacijenata. Perzistencija antibiotičke rezistencije predstavlja jedan od glavnih zdravstvenih problema na globalnom nivou i podstiče potrebu za pronalaženjem novih antimikrobnih agenasa i terapija protiv multiplo rezistentih bakterija.

Usled rastuće antibiotičke rezistencije, nekonvencionalni antimikrobni agensi poslednjih godina sve više postaju predmet interesovanja. Među alternativnim agensima najčešće se proučavaju bakteriofagi, antimikrobni peptidi, kao i etarska ulja, biljni ekstrakti i njihove bioaktivne komponente. Tradicionalna primena ovih prirodnih agenasa u lečenju različitih oboljenja je dobro poznata. Takođe, ovi agensi se sve češće koriste i u kombinaciji sa konvencionalnim antibioticima. Kombinovana terapija podrazumeva istovremenu primenu nekonvencionalnih i konvencionalnih antimikrobnih agenasa, pri čemu je antimikrobna aktivnost konvencionalnih agenasa smanjena zbog pojave rezistencije. Ovakve terapijske strategije su trenutno u razvoju i privlače sve veću pažnju i interesovanje naučne javnosti. Takođe, predstavljaju jednu od potencijalnih oblasti za buduća istraživanja u pravcu iskorišćavanja fito-farmaceutskih proizvoda kao novih agenasa sa potencijalom modifikacije rezistencije bakterija. Multidisciplinarni pristup u otkrivanju antimikrobnih agenasa, uključujući dizajn novih molekula baziranih na prirodnim proizvodima, a u kombinaciji sa savremenim i kombinatornim metodologijama, obezbeđuje najbolje rešenje za sadašnju krizu u produktivnosti sa kojom se susreće naučna zajednica koja se bavi otkrićem i razvojem novih antimikrobnih agenasa. Nova generacija pomenutih nekonvencionalnih, alternativnih antimikrobnih agenasa stavlja akcenat na razvoj i uspostavljanje novog mikrobiološkog i farmaceutskog poretka u borbi protiv antibiotičke rezistencije.

2. OPŠTI DEO

Acinetobacter baumannii je široko rasprostranjena, multiplo rezistentna bakterija, sa specifičnim genotipskim i fenotipskim (morfološkim, kulturnim i biohemijskim) osobinama. Ova bakterija je posebno interesantna zbog njene patogenosti, ali i mehanizama i stepena rezistencije, kako na konvecionalne, tako i na nekonvencionalne antimikrobne agense.

2.1. KARAKTERISTIKE GENOMSKE VRSTE *Acinetobacter baumannii*

Rod *Acinetobacter* ranije je svrstavan u familiju Neisseriaceae, sa jednom vrstom, *Acinetobacter calcoaceticus* (Brenner i sar., 2005). Kasnije taksonomske studije su ukazale da članove ovog roda treba uvrstiti u novu familiju - Moraxellaceae, koja uključuje rodove *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* i srodne bakterije i predstavlja diskretnu filometričku granu u superfamiliji II Proteobakterija, na bazi studija 16S rRNK i DNK-DNK hibridizacije (Bergogne-Berezin i Towner, 1996). Trenutni opis roda i naziv *Acinetobacter* (grč. *akinetos* - nepokretan) je prvi put upotrebljen 1954. godine, da bi se napravila razlika između pokretnih i nepokretnih mikroorganizama iz roda *Achromobacter* (Brisou i Prevot, 1954; Peleg i sar., 2008). Ovaj naziv je šire prihvaćen 1968. godine, nakon objavljivanja rada Baumann-a i njegovih saradnika koji su izolovali pripadnike ovog roda iz zemljišta i vode (Baumann i sar., 1968; Peleg i sar., 2008). Originalno je rod *Acinetobacter* uključivao heterogenu grupu nepokretnih, Gram negativnih, oksidaza pozitivnih i oksidaza negativnih saprofita, koji su se mogli razlikovati od drugih bakterija po nedostatku pigmentacije. Bakterije koje se danas svrstavaju u rod *Acinetobacter* ranije su bile klasifikovane pod najmanje 15 različitih srodnih imena, od kojih su najpoznatija *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Moraxella glucidolytica* i *Moraxella lwoffii* (Bergogne-Berezin i Towner, 1996). Danas ovaj rod uključuje Gram negativne kokoidne štapičaste bakterije, striktno aerobne, nepokretne, katalaza pozitivne i oksidaza negativne. Većina pripadnika roda raste na jednostavnim mineralnim medijumima koji sadrže amonijačne ili nitratne soli kao izvor azota i acetat, laktat ili piruvat kao jedini izvor ugljenika i energije (Brenner i sar., 2005).

Do sada je u okviru roda *Acinetobacter* izdvojeno najmanje 35 imenovanih i neimenovanih vrsta. Od ukupnog broja vrsta, 26 imaju definisana imena, a ostalih 9 samo privremena i ona se označavaju kao genomske vrste, jer se na osnovu svojih fenotipskih osobina ne mogu razlikovati od drugih vrsta (Di Nocera i sar., 2011; Brenner i sar., 2005). Naime, pojam vrste u klasičnoj mikrobiologiji podrazumeva grupu sojeva koji pokazuju visok stepen sličnosti u smislu fenotipskih osobina. Danas je opšte prihvaćeno da hibridizacija i sekvenciranje nukleinskih kiselina predstavljaju najracionalnije metode za razdvajanje vrsta i definisanje odnosa između različitih organizama. Na bazi ovih kriterijuma, u okviru roda *Acinetobacter*, utvrđeno je 9 DNK-DNK homologih grupa (genomskih vrsta).

Genomska vrsta 1 (*A. calcoaceticus*), genomska vrsta 2 (*A. baumannii*), i neimenovane genomske vrste 3 i 13TU su međusobno povezane i čine kompleks *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Acb kompleks). Tabela 2.1 prikazuje listu fenotipskih karakteristika koje omogućavaju delimičnu diferencijaciju vrsta ovog kompleksa (Brenner i sar., 2005).

Tabela 2.1. Fenotipska diferencijacija genomskih vrsta Acb kompleksa (Brenner i sar., 2005)

Karakteristika*	Genomske vrste			
	1	2	3	13TU
Rast na 41 °C	[-]	+	d	+
Rast na 44 °C	-	+	-	d
Rast u podlozi sa:				
L-arabinoza	d	[+]	d	+
D-glukarat	d	[+]	[+]	-
D-riboza	d	[+]	d	[+]
skorbinska kiselina	[-]	d	[-]	[+]
glicerat	[+]	[-]	d	[-]
levulinat	d	d	-	-
L-tartarat	[-]	d	[+]	-
acetil-L-glutamin	[-]	d	d	d
D-asparagin	+	-	-	[-]
L-hidroksiprolin	[-]	[+]	[-]	d

*+ svi sojevi su pozitivni, [+] više od 80 % sojeva je pozitivno, d 20- 79 % sojeva je pozitivno, [-] manje od 20 % sojeva je pozitivno, – svi sojevi su negativni

Druge metode koje se koriste u identifikaciji vrsta roda *Acinetobacter* (Dijkshoorn i sar., 1993) su bazirane na strukturnim karakteristikama sojeva i podrazumevaju serotipizaciju (Traub i Bauer, 1993), analizu sastava masnih kiselina (Kampfer, 1993), karakteristika proteina spoljašnje membrane (Ino i Nishimura, 1989) i detekciju elektroforetskog polimorfizma enzima malat dehidrogenaze, glutamat dehidrogenaze i katalaze (Bouvet i Jeanjean, 1995). Međutim, ni jedna od pomenutih metoda nije u potpunosti uspešna u krajnjoj identifikaciji izolovanih sojeva trenutno opisanih genomskih vrsta ovog roda.

Zbog poteškoća u fenotipskoj identifikaciji i velikog kliničkog začaja nekih genomskih vrsta, razvijene su brojne molekularne metode u cilju identifikacije *Acinetobacter* vrsta. Ove metode uključuju ribotipizaciju (Dijkshoorn i sar., 1993), restrikcionu analizu amplifikovanih (umnoženih) fragmenata rDNK (eng. *amplified rDNA restriction analysis* - ARDRA) (Vaneechoutte i sar., 1995; Dijkshoorn i sar., 1998; Jawad i sar., 1998; Kong i sar., 2011), analizu polimorfizama dužine restrikcionihih fragmenta (eng. *amplified fragment length polymorphism* - AFLP) (Janssen i sar., 1997; Nemeč i sar., 2001; Spence i sar., 2004), analizu 16S-23S rRNK (eng. *16S-23S rRNA spacer analysis*) (Dolzani i sar., 1995; Nowak i sar., 1995; Chang i sar., 2005) i analizu tRNK (eng. *tRNA spacer fingerprinting*) (Ehrenstein i sar., 1996).

Genomska vrsta *Acinetobacter baumannii* je prvi put identifikovana DNK-DNK hibridizacijom koju su 1986. godine izveli Bouvet i Grimont. Taksonomski položaj genomske vrste *Acinetobacter* prema Brenner i sar. (2005) danas izgleda ovako:

Regnum (Carstvo): Procariotae

Phylum (Razdeo): Proteobacteria

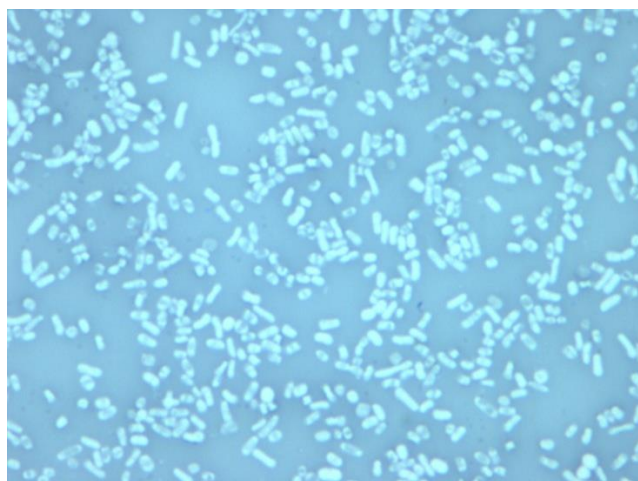
Classis (Klasa): Gammaproteobacteria

Ordo (Red): Pseudomonadales

Familia (Familija): Moraxellaceae

Genus (Rod): *Acinetobacter*.

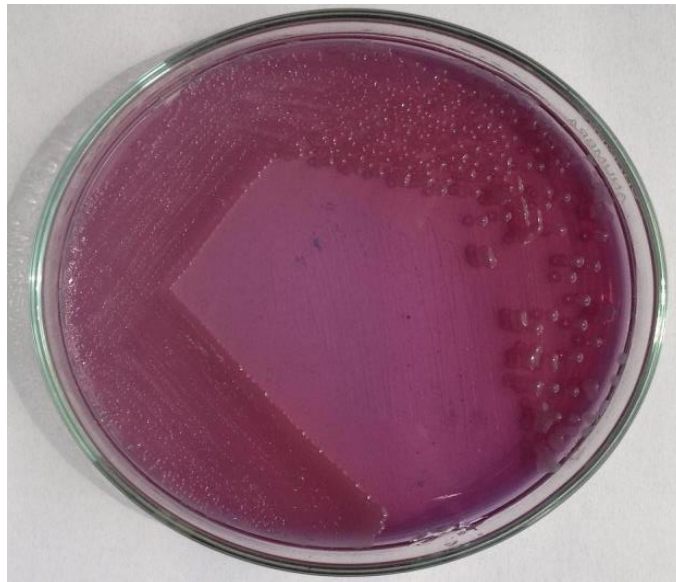
Genomska vrsta *Acinetobacter baumannii* je Gram negativna štapićasta bakterija dimenzija od 0,9-1,6 do 1,5-2,5 μm koja u stacionarnoj fazi rasta postaje kokoidna. To su kratke, zdepaste, a ponekad i okruglaste štapićaste bakterije koji mogu posedovati kapsulu. Čelije se najčešće javljaju u parovima ili kratkim lancima (slika 2.1). Ne obrazuju spore i ne poseduju flagele (Kurcik-Trajkovska, 2009). Nakon dvadesetčetvoročasovne inkubacije, na krvnom agaru, kao i ostali predstavnici Acb kompleksa, stvara glatke, sjajne, ispupčene, ponekad sluzave kolonije belo-krem boje, prečnika 1,5 do 3 mm, koje podsećaju na kolonije pripadnika familije Enterobacteriaceae.



Slika 2.1. Negativno bojenje ćelija *Acinetobacter baumannii* nigrozinom

Bakterije ove vrste striktni su aerobi i nemaju sposobnost fermentacije šećera. Poseduju sposobnost produkcije kiseline iz glukoze, galaktoze, manoze, ramnoze, laktoze i ksiloze procesom oksidacije. Takođe, usvajaju citrate, nemaju sposobnost redukcije nitrata, ne hidrolizuju eskulin i daju negativan metil-red i Voges-Proskauer test (Brenner i sar., 2005). Obično rastu na temperaturi između 20 °C i 37 °C. *A. baumannii* raste i na temperaturi od 44 °C za razliku od drugih vrsta Acb kompleksa, koje ne ispoljavaju ovu karakteristiku, mada postoje retki izuzeci. To je važna fenotipska osobina koja se koristi za identifikaciju. Za rast zahtevaju blago kiselu sredinu (Brenner i sar., 2005). Rezistentna je na penicilin i dobro raste na MacConekey agaru, formirajući blede-roze kolonije.

A. baumannii raste na mineralnom medijumu koji sadrži jedan izvor ugljenika i energije, kao što je etanol, acetat ili laktat. Neka organska jedinjenja, kao što su aminokiseline, mogu da posluže kao jedinstveni izvor ugljenika, energije i azota. Za izolaciju ove bakterije trenutno je u upotrebi nekoliko selektivnih i diferencijalnih medijuma. Prvi takav medijum je objavio Mendel 1964. godine. On sadrži agar, soja pepton, pankreatični hidrolizat kazeina, natrijum hlorid, laktozu, saharozu, žučne soli i bromkrezol ljubičasto. Medijum je kasnije modifikovan u Herella agar zamenom saharoze za maltozu. Na Herella agaru kolonije ove bakterije su blede ljubičate boje i lako se razlikuju od fermentišućih bakterija iz familije Enterobacteriaceae (slika 2.2). Druga podloga koja se koristi za izolaciju *A. baumannii* sojeva je takođe selektivna i diferencijalna opisana od strane Holtona. On je laktozu i bromkrezol ljubičasto zamenio manitolom, fruktozom, fenilalaninom i fenol crvenim (Jawad i sar., 1994). Pored ovih podloga *A. baumannii* je moguće kultivisati i na krvnom agaru, Eozin Metilen Blu agaru (EMB), Leeds Acinetobacter medijumu (LAM) i drugim podlogama.



Slika 2.2. Izgled kolonija *A. baumannii* na Herella agaru

Pripadnici roda *Acinetobacter* su ubikvitarni organizmi, te se stoga i vrsta *A. baumannii* takođe smatra sveprisutnim, široko rasprostranjenim mikroorganizmom. Međutim, nikada nije sprovedena studija sistematskog ispitivanja prirodnog staništa pojedinih vrsta ovog roda, među kojima je i genovrsta *A. baumannii* (Baumann, 1968; Fournier i Richet, 2006; Peleg i sar., 2008). *Acinetobacter baumannii* je prisutan u okruženju i uglavnom se nalazi kao saprofit u zemljištu, vodi, prehrambenim proizvodima, čest je mikrobiont čoveka (koža, disajni putevi i genitalni trakt), a izoluje se učestalo i sa medicinskih uređaja. Lako se izoluje iz krvi, sputuma, bronhijalnog ispirka, gnoja, urina kao i drenova katetera (Espinal i sar., 2012), a može se naći i u sirovom, opranom i smrznutom povrću, u svežim, smrznutim i

uskladištenim proizvodima od ribe i mesa, kao i u mleku i siru (Brenner i sar., 2005). Osim toga ova bakterija poseduje sposobnost preživljavanja i do nekoliko dana na površinama koje su nutritivno siromašne, a takođe je otporana na isušivanje i dezinfekciona sredstva. Prethodne studije su pokazale da genovrsta *A. baumannii* bolje podnosi isušivanje od drugih vrsta roda *Acinetobacter*, jer je u stanju da preživi i do 10 dana na česticama prašine, i više od četiri meseca na suvim ili vlažnim površinama kao što su guma, keramika i razne vrste medicinske opreme (Espinal i sar., 2012). *A. baumannii* je jedan od najčešćih nozokomijalnih patogena koji ugrožavaju humanu zdravstvenu zaštitu u 21. veku. Ovaj epitet je dobio zbog posedovanja genetskih determinatni multiple rezistencije, posedovanja tolerancije na širok opseg pH vrednosti, visok salinitet, nisku vlažnost, kao i jedinstvene sposobnosti preživljavanja na skoro svim izvorima hranljivih materija. Genovrsta *A. bauamnnii* je kao što je već napomenuto oportunistički humani patogen, uzročnik velikog broja različitih tipova infekcija.

Patogenost predstavlja sposobnost mikroorganizma da izazove oboljenje. Virulencija je stepen patogenosti i ona može da varira čak i među pripadnicima iste vrste. Virulenciji jedne vrste obično ne doprinosi samo jedan faktor, već ona zavisi od niza faktora, kao što je sam mikroorganizam, njegov domaćin i njihova interakcija (Winn i sar., 2005). Infekcija počinje kada balans između bakterijske patogenosti i otpornosti domaćina nije više stabilan (Peterson, 1996). Određene osobine genomske vrste *Acinetobacter baumannii* utiču na njenu virulenciju, a samim tim i na mogući razvoj infekcije. Osobine koje utiču na povećanje virulencije ove bakterije su prisustvo polisaharidne kapsule, sposobnost adhezije na humane epitelijalne ćelije pomoću pila ili kapsularnih polisaharida, produkcija enzima koji mogu oštetiti tkivne lipide i produkcija siderofora (Bergogne-Berezin i Towner, 1996). Polisaharidna kapsula ove vrste je izgrađena od L-ramnoze, D-glukoze, D-glukuronske kiseline i D-manoze (Kaplan i sar., 1985). Kapsula obavija celu ćeliju, omogućava joj adherenciju, sprečava fagocitozu bakterijske ćelije, ometa prodor antibiotika u bakterijsku ćeliju i najverovatnije daje izvesnu hidrofilitet površini ćelije (Bergogne-Berezin i Towner, 1996). Sposobnost adhezije za humane epitelijalne ćelije javlja se i zahvaljujući prisustvu pila. Bakterijska adhezija pomoću kapsule i pila predstavlja važnu osobinu koja omogućava prvi korak u izazivanju infekcije. Virulenciji ove vrste doprinosi i enzimsko aktivnost esteraza, nekih amino-peptidaza, ureaza i fosfataza. Takođe, potencijalno toksičnu ulogu imaju lipopolisaharidne komponente ćelijskog zida i lipid A. Produkcija endotoksina, tj. lipopolisaharida od strane *A. baumannii* je zajednička osobina svih Gram negativnih bakterija, jer predstavlja komponentu njihove spoljašnje membrane. Endotoksini uvek ispoljavaju slabiju toksičnost od egzotoksina, ali imaju veliku otpornost na visoke temperature. Lipid A je odgovoran za biološke efekte endotoksina, odnosno za groznicu, aktivaciju makrofaga i hemodinamične promene koje dovode do šoka i smrti (Peterson, 1996). Sa ovog aspekta je takođe od značaja još jedan faktor virulencije opisan kod *A. baumannii*, a to je ekspresija visoko-afinitetnih sistema za usvajanje gvožđa sastavljenih od siderofora (helatora gvožđa male molekulske mase),

komponentni sposobnih da konvertuju polimerne feri oksi-hidrokside u solubilne helate gvožđa (Neilands, 1995). Siderofori se sintetišu od strane izolata koji rastu u uslovima limitirane količine gvožđa (eng. *iron-limiting conditions*) (Neilands, 1995; Roca i sar., 2012). Tipovi siderofora koje srećemo među članovima roda *Acinetobacter* su: IROMPs (eng. *iron-repressible outer membrane proteins*), tj. gvožđe represivni proteini spoljašnje membrane, siderofore kateholaminskog tipa kakva je i komercijalno dostupna 2,3-dihidroksibenzolna kiselina (DHBA), a Yamamoto i sar. (1994) su objavili stukturu novog siderofora – acinetobaktina sa kateholaminskim i hidroksamatnim funkcionalnim grupama izolovanog iz *A. baumannii*. Međutim, dosadašnja istraživanja su pokazala da *A. baumannii* ne poseduje izraženu virulenciju. Dokazano je da infekcije koje uzrokuju ove bakterije zajedno sa drugim vrstama (tzv. mešovite infekcije), predstavljaju možda veći problem od onih koje izazivaju isključivo bakterije roda *Acinetobacter* (Obana, 1986).

A. baumannii je klinički dominantna vrsta sa izraženom tendencijom izazivanja nozokomijalnih infekcija, posebno u jedinicama intenzivne nege (Gandham i sar., 2012; Lockhart i sar., 2007). U jednoj studiji je od 584 *Acinetobacter* sojeva izolovanih kod 420 pacijenata u periodu dužem od 12 meseci, čak 426 (72,9 %) sojeva identifikovano kao *A. baumannii* (Seifet i sar., 1994). Ova genovrsta kolonizuje usnu duplju, respiratorni i gastrointestinalni trakt, a kao oportunistički patogen može biti značajan uzročnik različitih teških intrahospitalnih infekcija. Najčešće su u pitanju bakterijemije, nozokomijalne pneumonije koje se javljaju kod pacijenata kojima je neophodna mehanička ventilacija, infekcije urinarnog trakta, infekcije rana (najčešće hirurških), kože i mekih tkiva, kao i sekundarni meningitis i endokarditis (Tomaras i sar., 2003, McQueary i Actis, 2011). Ovim infekcijama su podložniji imunoinkompetentni i imunokompromitovani pacijenti, pacijenti sa teškom osnovnom bolešću, kao i oni kod kojih su rađene invazivne dijagnostičke procedure. Ova bakterija je odgovorna za nastajanje bolničkih infekcija, i zbog izražene sposobnosti formiranja biofilma na površini implantabilnih medicinskih uređaja (Mhamedi i sar., 2014), kao što su urinarni kateter, centralni venski kateter i endotrahealna tuba (Longo i sar., 2014).

A. baumannii predstavlja značajan patogeni mikroorganizam, budući da brzo razvija rezistenciju na veliki broj antibiotika, uključujući većinu β -laktamskih antibiotika i aminoglikozida (Towner, 2006). Učestalost bolničkih infekcija uzrokovanih ovom vrstom na hirurškim odeljenjima i u jedinicama intenzivne nege je u porastu. U evropskim zemljama ona iznosi od 2-10 % svih infekcija uzrokovanih Gram negativnim bakterijama, a u Americi 2,5 % (Medić i sar., 2011). Studija učestalosti izolacije sojeva *Acinetobacter* spp. iz briseva rana tokom 2009-2010. godine u institutima i klinikama Kliničkog centra Vojvodine (KCV) je pokazala da je ovaj uzročnik najčešće izolovan u Institutu za hirurgiju i to na Klinici za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju (29,15 % ukupnog broja *Acinetobacter* spp.), Klinici za ortopedsku hirurgiju i traumatologiju (14,76 %), Klinici za vaskularnu i transplantacionu hirurgiju (8,49 %) i Klinici za anesteziju i intenzivnu terapiju (6,27 %) (Medić i sar., 2011). Mortalitet kod pacijenata kod kojih je detektovana infekcija bakterijom *A. baumannii* može

biti visok, čak i do 75 % (Smith i sar., 2007). Faktori koji povećavaju verovatnoću infekcije ovom bakterijom su starost, operativni zahvati, hronične bolesti, imunosupresija, neadekvatna upotreba antimikrobnih agenasa i prisustvo invazivnih medicinskih instrumenata. Detektovana infekcija *A. baumannii* zahteva izolovanje pacijenata i dekontaminaciju materijala sa kojim je pacijent bio u kontaktu. Ove mere su neophodne zbog sprečavanja širenja infekcije ove multiplo rezistentne bakterije (Boukadida, 2000).

U mnogim institucijama, veliki broj *A. baumannii* izolata je poreklom iz respiratornog trakta bolničkih pacijenata. Iako se veoma teško razlikuje kolonizacija gornjih disajnih puteva od prave pneumonije, nema sumnje da je uzročnik prave, mehaničkom ventilacijom indukovane pneumonije upravo genovrsta *A. baumannii*. Prema rezultatima velikih studija monitoringa, između 5 i 10 % slučajeva pneumonija u jedinicama intenzivne nege izazvano je ovom vrstom (Gaynes i Edwards, 2005). Međutim, postoji verovatnoća da je u jedinicama intenzivne nege određenih institucija ovaj procenat mnogo veći. Pojavu pneumonija izvan bolnica, čiji je etiološki faktor *A. baumannii*, karakteriše munjevit klinički tok, sekundarne infekcije krvotoka i stopa mortaliteta od 40 do 60 %. Izvor ovih infekcija može biti prisustvo *A. baumannii* u grlu, što je slučaj kod 10 % ljudi koji prekomerno konzumiraju alkohol (Anstey i sar., 2002).

Nozokomijalni, postoperativni meningitis uzrokovan od strane *A. baumannii* predstavlja sve važniju intrahospitalnu infekciju. Epidemiologija nozokomijalnog meningitisa evoluirala u pravcu uključivanja sve većeg broja Gram negativnih patogena, tako da ne čudi činjenica da je i multiplo rezistentni *A. baumannii* jedan od njih (Metan i sar., 2007b). Tipični pacijenti oboleli od meningitisa izazvanog vrstom *A. baumannii* su imali neurohiruršku intervenciju i imaju spoljašnji ventrikularni dren. Mortalitet može biti čak i do 70 %, iako se u ovakvim slučajevima uzrok smrtnosti često teško razlikuje zbog primarne bolesti (Metan i sar., 2007a).

U velikoj studiji nozokomijalnih infekcija krvotoka sprovedenoj u periodu 1995-2002 u SAD, vrsta *A. baumannii* je bila deseti najčešći etiološki agens, odgovorna za 1,3 % svih mono-mikrobnih nozokomijalnih infekcija krvotoka. Ukupna smrtnost usled infekcija krvotoka izazvanih bakterijom *A. baumannii* bila je od 34 do 43,4 % u jedinicama intenzivne nege i 16,3 % izvan jedinica intenzivne nege. *A. baumannii* infekcije krvotoka imale su treću najveću ukupnu stopu smrtnosti u jedinicama intenzivne nege, posle infekcija izazvanih vrstama *P. aeruginosa* i *Candida* sp. (Wisplinghoff i sar., 2004).

Osim infekcija krvotoka, *A. baumannii* često uzrokuje infekcije kože i mekih tkiva. Uzročnik je 2,1 % infekcija kože i mekih tkiva u jedinicama intenzivne nege (Gaynes i Edwards, 2005). Ova bakterija je postala posebno popularna tokom rata u Iraku i Avganistanu, pošto je bila izolovana kod čak 32,5 % slučajeva pacijenata sa otvorenim prelomima cevanice (Johnson i sar., 2007). Zbog toga se ova bakterija često kolokvijalno naziva 'Iraqibacter'.

Takođe, *A. baumannii* je čest uzročnik i infekcija urinarnog trakta, gde je samo u jednoj studiji bio odgovoran za 1,6 % urinarnih infekcija u jedinicama intenzivne nege (Gaynes i

Edwards, 2005). Uglavnom se ova bakterija dovodi u vezu sa infekcijama izazvanim kolonizacijom i/ili usled upotebe katetera, dok kod zdravih pacijenata koji se leče ambulantno nije značajan etiološki agens (Peleg i sar., 2008).

Imajući u vidu mogućnost *A. baumannii* da kolonizuje i inficira kritično obolele pacijente, koji često imaju lošu prognozu, bez obzira na komplikacije izazvane sekundarnim infekcijama, utvrđivanje stvarnog kliničkog značaja ovog patogena predstavlja izazov. Bez obzira na ovu činjenicu, bitno je istaći da kada je ishod *A. baumannii* bakteremija direktno upoređen sa pacijentima kod kojih su bakteremije izazvane drugim Gram negativnim bakterijama, uključujući i vrstu *Klebsiella pneumoniae*, značajno veća stopa smrtnosti je zabeležena kod pacijenata inficiranih upravo vrstom *A. baumannii* (Jerassy i sar., 2006; Robenshtok i sar., 2006). Druga studija je takođe dokazala značajno veću stopu smrtnosti nakon kolonizacije ili infekcije multiplo rezistentnim sojevima *A. baumannii* u poređenju sa multiplo rezistentnim sojevima *P. aeruginosa* (Gkrania-Klotsas i Hershov, 2006). Svi navedeni literaturni podaci predstavljaju razloge zbog kojih je neophodno što bolje poznavanje osobina *A. baumannii* koje doprinose rezistenciji ove vrste.

2.2. OSETLJIVOST VRSTE *A. baumannii* NA KONVENCIONALNE ANTIMIKROBNE AGENSE

Osobina genovrste *A. baumannii*, zbog koje je posebno dobila na značaju je veoma visok stepen rezistencije na konvencionalne antibiotike. Antibiotička rezistencija se javlja kao konstitutivna i indukovana. Konstitutivna ili urođena rezistencija bakterija prema antibioticima podrazumeva odsustvo ciljane komponente na koju deluje antibiotik u okviru bakterijske ćelije. Da bi došlo do pojave ove vrste rezistencije, nije potreban predhodni kontakt bakterijske ćelije sa antibiotikom. Za razliku od urođene, indukovana (stečena) rezistencija nastaje nakon kontakta bakterijske ćelije sa antibiotikom, a može biti fenotipska i genotipska. Fenotipska rezistencija zavisi od metaboličke aktivnosti bakterijske ćelije, jer antibiotici deluju na metabolički aktivne ćelije, a ne deluju na bakterijske ćelije u stanju anabioze. Genotipska rezistencija je posledica promena u genomu bakterije. Osnovni put kojim dolazi do ovakvih genotipskih promena su mutacije, koje omogućavaju *de novo* pojavu rezistencije, a širenje rezistencije se vrši vertikalnim i horizontalnim transferom genetskog materijala (Knežević, 2012).

Složena genetička determinisanost bakterijske rezistencije omogućava da se u genomu jedne bakterije može naći veći broj različitih gena koji obezbeđuju rezistenciju na brojne konvencionalne antimikrobne agense (Knežević, 2012). Kao posledica ovoga pojavljuje se multipla rezistencija, koji podrazumeva da je bakterijski soj rezistentan na najmanje dva hemijski raznorodna antibiotika na koje je bakterija prirodno osetljiva, ali je vremenom i usled česte primene antibiotika razvila mehanizme rezistencije (Knežević, 2005; Knežević i Petrović, 2008a; Knežević, 2012).

Konvencionalni antimikrobni agensi koji se najčešće koriste u tretmanu infekcija izazvanih vrstom *A. baumannii* se mogu svrstati u pet grupa: cefalosporini (ceftriakson, ceftazidim ili cefepim), karbapenemi (imipenem ili meropenem), aminoglikozidi (gentamicin, tobramicin ili amikacin), fluorohinoloni (ciprofloksacin ili levofloksacin) i kombinacija ampicilin-sulbaktam (Peleg i sar., 2008). Prema istim autorima, multipla rezistencija (eng. *multidrug-resistant*, MDR) *A. baumannii* podrazumeva rezistenciju na više od dve predhodno navedene grupe antimikrobnih agenasa. Za razliku od pojma multiple rezistencije, uprkos činjenici da „*pan*“ znači „sve“, pan-rezistencija (eng. *pandrug-resistant*, PDR) se često definiše kao rezistencija na sve antimikrobne agense koji se koriste kao prva linija prilikom ispitivanja osetljivosti bakterija i poseduju terapijski potencijal protiv *A. baumannii* sojeva. Prema ovoj definiciji za *A. baumannii* sojeve koji se karakterišu kao pan-rezistentni podrazumeva se da su rezistentni na sve β -laktame (uključujući i karbapeneme i sulbaktam), fluorohinolone i aminoglikozide (Peleg i sar., 2008). Međutim, sa porastom upotrebe polimiksina i tigeciklina (Go i sar., 1994), ova definicija moraće verovatno da obuhvati i druge agense, a sve češće je u potrebi i termin ekstenzivno rezistentni (eng. *extensively drug-resistant*, XDR) sojevi. Prema predlogu ECDC (European Centre for Disease Prevention and

Control) na osnovu kriterijuma rezistencije na konvencionalne antimikrobne agense iz 10 navedenih kategorija (tabela 2.2) klasifikacija *Acinetobacter* spp. sojeva obuhvata tri grupe:

1. MDR: rezistentan ili umereno osetljiv na 1 ili više agenasa u 3 ili više kategorija,
2. XDR: rezistentan ili umereno osetljiv na 1 ili više agenasa u 8 ili više kategorija,
3. PDR: rezistentan ili umereno osetljiv na sve antimikrobne agense iz 10 navedenih antimikrobnih kategorija (Magiorakos i sar., 2012).

Tabela 2.2. Antimikrobne kategorije i agensi za definisanje osetljivosti *Acinetobacter* spp. (Magiorakos i sar., 2012; Abbott i sar., 2013)

Antimikrobna kategorija	Antimikrobni agens
Aminoglikozidi	Gentamicin Tobramicin Amikacin Netilmicin
Anti-pseudomonas karbapenemi	Imipenem Meropenem Doripenem Ertapenem*
Anti-pseudomonas fluorohinoloni	Ciprofloksacin Levofloksacin
Anti-pseudomonas penicilini (inhibitori beta-laktamaza)	Piperacilin-tazobaktam Tikarcilin-klavulonska kis. Amoksicilin-klavulonska k.*
Cefalosporini širokog spektra	Cefotaksim Ceftriakson Ceftazidim Cefepim
Inhibitori folatnog puta	Trimetoprim-sulfametoksazol
Penicilini + inhibitori beta-laktamaza	Ampicilin-sulbaktam
Polimiksini	Kolistin Polimikin B
Tetraciklini	Tetraciklin Doksiciklin Minociklin Tigeciklin*
Fenikoli	Hloramfenikol*

* antibiotici prema Abbott i sar. (2013) koje bi trebalo dodatno uključiti u analizu

Acinetobacter baumannii je veoma brzo razvio rezistenciju na konvencionalne antimikrobne agense. Početkom 70-ih godina prošlog veka, infekcije izazvane ovom genovrstom su tretirane gentamicinom, minociklinom, nalidiksinskom kiselinom, ampicilinom i karbenicilinom. Međutim, u periodu od 1971. do 1974. godine ova bakterija je postala rezistentna na pomenute antimikrobne agense (Zarrilli i sar., 2004), da bi početkom 90-ih godina bila okarakterisana kao multiplo rezistentna, jer je ispoljavala rezistenciju na peniciline, cefalosporine uskog i širokog spektra (Zarrilli i sar., 2004), aminoglikozide (Seward i sar., 1998), hloramfenikol, tetraciklin i fluorohinolone (Fournier i sar., 2006). Krajem 90-ih godina karbapenemi su bili jedini preostali izbor za lečenje infekcija izazvanih

ovom bakterijskom vrstom, ali se rezistencija na karbapenem već tada pojavila (Zarrilli i sar., 2004). Rifampicin je uveden u kliničku praksu u kombinaciji sa karbapenemima, ali takođe je dokazana rezistencija i iz tog razloga je počela upotreba tigeciklina, polimiksina B i kolistina. Međutim, danas je dokazana rezistencija i na ove antibiotike, što čini ovu vrstu ekstenzivno rezistentnom i jednom od najvećih pretnji današnjice. Prijavljivanje *A. baumannii* sojeva rezistentnih na sve poznate antibiotike, predstavlja važan signal i upozorenje da je potrebna što hitnija reakcija međunarodne zdravstvene zajednice (Peleg i sar., 2008). Ubrzano globalno širenje *A. baumannii* izolata rezistentnih na veliki broj konvencionalnih antibiotika oslikava potencijal ovog organizma da brzo odgovori na promene pri selektivnom pritisku prirodne sredine.

A. baumannii je postao klinički najzačajniji u poslednjih 15 godina zbog izuzetne sposobnosti sticanja i/ili povećane ekspresije postojećih (eng. *up-regulation*) determinanti rezistencije. Kod *A. baumannii* dokazano je prisustvo pojedinačnih determinanti rezistencije i/ili determinanti u okviru mobilnih genetičkih elemenata, koje su zajedno smeštene u okviru velikih delova hromozoma, poznatih pod nazivom genomska ostrva rezistencije (eng. *genomic resistance island* - GRI). Detektovano je ukupno četiri ostrva rezistencije u genomima sojeva ove genovrste (AbaR1, AbaR2, AbaR3 i AbaR4). Fournijer i sar. (2006) su se u svojoj studiji bavili tipizacijom genetske prilagodljivosti i karakterizacijom širokog arsenala determinanti rezistencije *A. baumannii* sojeva. Nakon sekvenciranja ceolog genoma kliničkog izolata *A. baumannii* iz Francuske (grupa evropski klon I) identifikovano je genomsko ostrvo rezistencije AbaR1 veličine 86 kb, jedno od najvećih opisanih ostrva rezistencije (Fournijer i sar., 2006). U ovom regionu genoma predviđeno je 88 otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frames* - ORFs), od kojih je čak 82 ORF poreklom od drugih Gram negativnih bakterija, kao što su *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. i *Escherichia coli* (Fournijer i sar., 2006). Osim toga, u ovoj studiji identifikovano je 52 gena rezistencije i iznenađujuća je činjenica da je čak 45 gena (86,5 %) lokalizovano u AbaR1 ostrvu rezistencije. Pozicija genetičkih determinanti rezistencije predstavlja dokaz izražene genetičke varijabilnosti vrste *A. baumannii*, jer je identifikovan niz mobilnih genetičkih elemenata sa širokim spektrom domaćina (eng. *broad-host-range mobile genetic elements*), uključujući tri elementa: integrone klase 1, transpozone i insercione sekvence (IS). AbaR2 genomsko ostrvo rezistencije je pronađeno u genomu *A. baumannii* soja iz grupe evropski klon II. Ono je manje od AbaR1 (19,5 kb), a sadrži integron klase 1 i sedam gena rezistencije (Iacono i sar., 2008). Zanimljivo je napomenuti da su u ovoj studiji u okviru plazmida pACICU1 detektovane čak dve kopije gena *bla_{OXA-58}*. Preostala dva genomska ostrva rezistencije (AbaR3 i AbaR4) su detektovana u kliničkom izolatu AB0057 (Adams i sar., 2008). Potvrđeno je da su sva genomska ostrva bila insertovana u okviru gena koji kodira ATPazu, koji je kasnije okarakterisan kao specifično mesto integracije (eng. *integron hot spot*) (Iacono i sar., 2008; Adams i sar., 2008).

U intra- i interspecijskoj razmeni gena odgovornih za rezistenciju, važnu ulogu igra lokalizacija ovih gena u okviru integrona (Stokes i Hall, 1989). Integroni su konzervisani DNK elementi slični transpozonomima, koji poseduju sposobnost da zarobe i mobilizuju genske kasete. Poznati po svojoj ulozi „hvatanja“ i širenja determinanti antibiotske rezistencije među Gram negativnim kliničkim izolatima, smatra se da integroni igraju primarnu ulogu u evoluciji bakterija (Rowe-Magnus i Mazel, 2002). Integroni, kao transpozabilni genetički elementi, poseduju sposobnost prelaska sa plazmida na bakterijski hromozom i obrnuto, čime omogućavaju transfer i trajno ugrađivanje gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju. Inercija i isecanje ovih kasete posredovani su aktivnošću rekombinaza, koje specifično prepoznaju određena mesta (eng. *site-specific recombinase*), a pripadaju porodici integrazata. Osobine na osnovu kojih se integroni mogu prepoznati predstavljaju tri komponente smeštene u okviru konzervisanog 5' regiona: (1) gen (*intI*) koji kodira Int1 integrazu, (2) gen (*attI*) koji kodira mesto integracije kasete, i (3) jedan ili više promotora odgovornih za ekspresiju genskih kasete. Na osnovu sekvenci *intI* gena, opisano je četiri klase integrona, od kojih prve tri klase sadrže genske kasete antibiotske rezistencije. Do sada je identifikovano približno 60 različitih genskih kasete, od kojih većina kodira rezistenciju na antibiotike (Hall i Collis, 1995; Fluit i Schmitz, 1999; Stokes i Hall, 1989). Integroni klase 1 su pretežno povezani sa *sulI* genom kao deo 3' konzervisanog segmenta (Stokes i Hall, 1989), dok integroni klase 2 obuhvataju transpozon Tn7 i srodne transpozone (Hall i Collis, 1995). Većina integrona pripada klasi 1 i prevažno se mogu naći kod kliničkih izolata Gram negativnih bakterija, kao što je *A. baumannii* (Gallego i Kevin, 2001). Integron klase 1 je čest kod *A. baumannii* kliničkih izolata, i u njemu su lokalizovani geni za rezistenciju na aminoglikozide, cefalosporine uskog i širokog spektra, metalo- β laktame, sulfonamide i hloramfenikol (Fournier i sar., 2006). Iz tog razloga nije iznenađujuća činjenica da su *A. baumannii* sojevi nosioci integrona u mnogo većoj meri rezistentni na antimikrobne agense u odnosu na sojeve bez njih (Gu i sar., 2007). Kod *A. baumannii* sojeva integron klase 1 često sadrži niz kasete sa genima za rezistenciju, naročito genima koji kodiraju aminoglikozid-modifikujuće enzime. Osim prisustva kodirajućih gena za aminoglikozid-modifikujuće enzime, u okviru integrona klase 1 ove bakterije opisane su sve velike klase enzima uključujući acetiltransferaze, nukleotidiltransferaze i fosfotransferaze (Hujer i sar., 2006). Ovaj tip rezistencije narušava i smanjuje vezivanje aminoglikozida za njihovo ciljno mesto utičući na pojavu visokog stepena rezistencije na sve klinički korisne aminoglikozide, uključujući gentamicin, tobramicin i amikacin (Doi i Arakawa, 2007). Kada su u pitanju ostali antimikrobni agensi, rezistencija je posredovana genima za rezistenciju na antiseptike (*gac* gen), sulfonamide (*sul* gen), trimetoprim (*dhfr* gen) i hloramfenikol (*cat* gen) koji se takođe nalaze u okviru integrona *A. baumannii* sojeva (Gu i sar., 2007).

Determinante rezistencije van integrona se nalaze na različitim mestima na hromozomu ili plazmidima *A. baumannii*. Najčešći geni rezistencije su stečeni geni koji kodiraju karbapenem hidrolaze, geni za cefalosporinaze uskog i širokog spektra (Brown i sar., 2005;

Heritier i sar., 2005; Naas i sar., 2006) i geni za rezistenciju na aminoglikozide (Fournier i sar., 2006). Detektovana je takođe rezistencija na hinolone (*qnr* geni) kodirana plazmidom.

Antibiotici kao prirodni produkti postoje milionima godina, a isto toliko dugo postoje i mehanizmi odbarne samih mikroorganizama od njih (Knežević, 2012). Širok spektar mehanizama rezistencije na antimikrobne agense je opisan za genomsku vrstu *A. baumannii*. Detektovani mehanizmi rezistencije su zaista impresivni i predstavljaju ozbiljnu konkurenciju mehanizmima rezistencije ostalih nefermentativnih Gram negativnih patogena (Perez i sar., 2007; Poirel i Nordmann, 2006). Kako je prethodno istaknuto, mehanizmi rezistencije *A. baumannii* na konvencionalne antimikrobne agense su urođeni ili stečeni. Vertikalni transfer gena je odgovoran za urođene mehanizme rezistencije, dok su stečeni mehanizmi rezistencije posledica i inter- ili intra-specijskog horizontalnog transfera gena (procesi transdukcije, transformacije i konjugacije). Iako su sva tri modela horizontalnog transfera gena zastupljena kod *A. baumannii*, dokazano je da samo konjugacija igra važnu ulogu u prenosu i širenju gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju (Bergogne-Bérézin i Towner, 1996). Ove urođene i stečene determinate antibiotske rezistencije su rasute u genomu u vidu nezavisnih gena, u okviru mobilnih gentičkih elemenata, transpozabilnih insercionih sekvenci, i u okviru ranije opisanih integrona i/ili genomskih ostrva rezistencije. Ushodna regulacija urođenih mehanizama rezistencije i usvajanje stečenih determinanti rezistencije predstavljaju osobine koje vrsti *A. baumannii* omogućavaju opstanak u različitim uslovima sredine.

Postoji četiri najvažnija mehanizma odgovorna za rezistenciju genovrste *A. baumannii*: (1) aktivni transport antibiotika iz ćelije, (2) smanjena propustljivost ćelijskog zida bakterijske ćelije za antibiotike, (3) enzimaska inaktivacija antibiotika, i (4) modifikacija ciljnog molekula za antibiotik.

Efluksni sistemi predstavljaju transmembranske proteinske strukture, čija je osnovna uloga odstranjivanje, tj. aktivno izbacivanje hemijskih jedinjenja, koja bi potencijalno mogla da utiču na dezorganizaciju citoplazmatske membrane. Genom multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva kodira širok spektar efluksnih sistema (Fournier i sar., 2006). RND familija (eng. *Resistance-nodulation-cell division family*) efluksnih pumpi detektovanih kod *A. baumannii* podrazumeva dva efluksna sistema AdeABC i AdeIJK. Sistem efluksnih pumpi AdeABC je kodiran *adeRS* genima, pri čemu tačkaste mutacije regulatornog gena (*adeR*) ili gena senzor-kinaze (*adeS*) dovode do aktivacije efluksnog sistema. Supstrati koje ova efluksna pumpa AdeABC izbacuje iz ćelije su β -laktami, aminoglikozidi, cefotaksim, eritomicin, hloramfenikol, tetraciklini, fluorohinoloni, trimetoprim i etidijum bromid (Higgins i sar., 2004; Heritier i sar., 2005; Peleg i sar., 2008), što dovodi do visokog stepena rezistencije *A. baumannii*. Rezistencija na karbapenem je takođe posredovana visokim nivoom ekspresije AdeABC efluksne pumpe zajedno sa karbapenem-hidrolizujućom aktivnošću (Hu i sat., 2007). AdeIJK, drugi sistem RND efluksnih pumpi, favorizuje amfifilna jedinjenja kao supstrate i sinergistički doprinosi aktivnosti efluksnih pumpi AdeABC sistema u izbacivanju tige ciklina iz ćelija (Damier-Piolle i sar., 2008). Kod *A.*

baumannii su detektovane još i TetA i TetB pumpe iz superfamilije MFS (eng. *Major Facilitator Superfamily*) pumpi uskog spektra dejstva. Obe pumpe su odgovorne za rezistenciju na tetracikline i minocikline, a kodirane su genom *tetA* odgovornom za rezistenciju na tertaciklin i genom *tetB* odgovornom za otpornost *A. baumannii* na doksiciklin (Marti i sar., 2006; Ribera i sar., 2003). Aktivnost efluksne pumpe AbeM, iz familije MATE (eng. *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) pumpi, odgovorna je za rezistenciju *A. baumannii* na hinolone, hloramfenikol, kanamicin, gentamicin i trimetoprim (Su i sar., 2005). Efluksna pumpa AbeS iz familije SMR pumpi (eng. *Smal Multidrug Resistance Family*), pripada maloj grupi multiplo rezistentnih, integralnih proteina i učestvuje u rezistenciji *A. baumannii* na hinolone i hloramfenikol (Srinivasan i sar., 2009).

Rezistencija može biti ostvarena ili dodatno povećana promenama u propustljivosti ćelijskog zida, a javlja se kao posledica gubitka ili promena u strukturi proteina spoljašnje membrane (eng. *Outer Membrane Proteins* - OMPs). Ovi proteini imaju ulogu porinskih kanala prilikom transporta antibiotika kroz spoljašnju membranu do antibiotik-vezujućih proteina. Promena u proteinima spoljašnje membrane (porinima) i promene u afinitetu ili ekspresiji penicilin vezujućeg proteina 2 (PBP-2) su važni mehanizmi rezistencije *A. baumannii*, naročito na antibiotike iz klase β -laktama (uključujući i karbapeneme) (Limansky i sar., 2002; Fernandez-Cuenca i sar., 2003; Heritier i sar., 2005). U odnosu na ostale Gram negativne patogene, veoma malo se zna o proteinima spoljašnje membrane *A. baumannii*. Poznato je da ova bakterija ima relativno mali broj porina što verovatno doprinosi kompleksnosti njene antibiotske rezistencije. Gubitak porinskih proteina najčešće je odgovoran za otpornost koju ćelija razvija prema β -laktamima. Utvrđeno je da gubitak proteina veličine 29 kDa, poznatog pod nazivom CarO, povezan sa rezistencijom ove bakterijske vrste na imipenem i meropenem (Limansky i sar., 2002). Kod CarO proteina nije pronađeno specifično imipenem-vezujuće mesto, što ukazuje da ovaj porin formira nespecifične kanale, za razliku od proteina Omp25, drugog opisanog membranskog proteina kod *A. baumannii*, koji je identifikovan zajedno sa CarO, ali ne poseduje sposobnost formiranja pora (Siroy i sar., 2005). Protein OmpA je razmatran kao potencijalna determinanta virulencije *A. baumannii*, jer je utvrđeno da je homolog OmpA i OmpF porina kod *Enterobacteriaceae* i *P. aeruginosa* i služi kao spori kanal za β -laktamske antibiotike. Osim CarO, protein veličine 43 kDa, homolog OprD proteina, odgovoran je za rezistenciju *A. baumannii* na imipenem (Dupont i sar., 2005).

Enzimski inaktivacija antibiotika je najdominantniji mehanizam rezistencije *A. baumannii* sojeva na aminoglikozide, β -laktamske antibiotike i hloramfenikol. Enzimski degradacija β -laktamskih antibiotika posredovana je aktivnošću enzima β -laktamaze, koje vrše razgradnju ovih antibiotika hidrolizom β -laktamskog prstena. Beta laktamaze proširenog spektra dejstva (eng. *Extended-Spectrum- β -Lactamases* - ESBLs) su odgovorne za rezistenciju na peniciline i cefalosporine prve, druge i treće generacije, ali nisu uključene u rezistenciju na cefamicine i karbapeneme (Stojanović, 2010). Najbrojnija grupa enzima ove

vrste su cefalosporinaze neinducibilnog AmpC tipa, koje su takođe poznate i kao *Acinetobacter*-izvedene cefalosporinaze (eng. *Acinetobacter*-Derived Cephalosporinases - ADCs), a geni odgovorni za njihovu sintezu su smešteni na hromozomu i odgovorni su za urođenu antibiotsku rezistenciju *A. baumannii* (Hujer i sar., 2005; Hujer i sar., 2006; Ruiz i sar., 2007). S obzirom da cefalosporinaze nisu inducibilne prirode i poseduju nizak nivo ekspresije, ključna determinanta u regulaciji prekomerne genske ekspresije ovih enzima kod *A. baumannii* je prisustvo IS elementa poznatog kao ISAbal1 smeštenog u promotornom regionu ovih gena (Corvec i sar., 2003; Ruiz i sar., 2007). Četiri enzima ove grupe, označena ACE-1 do ACE-4, su naročito dobro proučena, i obezbeđuju rezistenciju na cefaloridin i cefradin (Hujer i sar., 2005). Osim cefalosporinaza, kod *A. baumannii* ostale β-laktamaze proširenog spektra dejstva ne igraju tako važnu ulogu u rezistenciji na β-laktame. Međutim, uočen je porast broja *A. baumannii* izolata nosioca kodirajućih gena za enzime TEM-1/2, SHV, CTX-M, PER-1 i VEB-1 (Poirel i sar., 1999). Za sve njih je karakteristično da se njihovi geni nalaze na plazmidima, da u manjoj ili većoj meri mogu biti inhibirani klavulanskom kiselinom i da su njihovi supstrati penicilini (Poirel i sar., 2005). Takođe, istraživanja fokusirana na PER-1 tip β-laktamaza potvrđuju njihovo prenošenje kroz bolnice u Francuskoj, Turskoj, Belgiji, Rumuniji, Koreji i Americi (Hujer i sar., 2006; Naas i sar., 2006; Naas i sar., 2007; Poirel i sar., 1999; Vahaboglu i sar., 1997; Yong i sar., 2003), a dokazano je da efikasno hidrolizuju peniciline i cefalosporine, naročito ceftriakson, cefotaksim, ceftazidim i aztreonam (Paterson i Bonomo, 2005; Vahaboglu i sar., 1995; Nordmann i Naas, 1994). Gen za ovaj tip β-laktamaza nosi naziv *bla*_{PER-1} i može se nalaziti na plazmidu ili hromozomu. Ovaj gen takođe ima uzvodni IS element (*ISPa12*) koji pojačava njegovu ekspresiju (Poirel i sar., 2005). *A. baumannii* karakteriše produkcija serin i metalo-β-laktamaza ili karbapenemaza. Među serin-β-laktamazama kod *A. baumannii* najčešće se sreće ARI-1 enzim, koji hidrolizuje imipenem (Paton i sar., 1993). Opisano je i nekoliko tipova metalo-β-laktamaza (OXA, IMO i VIM tip metalo-β-laktamaza) čiji su kodirajući geni smešteni u okviru integrona. Kao što je već istaknuto, mehanizam enzimske inaktivacije antibiotika odgovoran je i za rezistenciju *A. baumannii* sojeva na aminoglikozide. Ovaj mehanizam je posredovan aktivnošću enzima aminoglikozidaza, koji inhibiraju ove antibiotike prenošenjem acetilne, fosfatne ili adenilil grupe sa supstrata na antibiotike (Lambert, 2002). Kod *A. baumannii* potvrđeno je prisustvo sva tri tipa enzima koji modifikuju aminoglikozide, a to su acetilaze (AAC), adenilaze (ANT) i fosfotransferaze (APH). Među enzimima ove grupe, najširi spektar dejstva imaju enzim AAC(3)IV, koji obezbeđuje rezistenciju na gentamicin, paramicin, dibekacin, netilmicin, sisomicin, i tobramicin, zatim enzim ANT(2")I koji je odgovoran za rezistenciju na gentamicin, dibekacin, sisomicin i tobramicin, i enzim APH(3')IV koji posreduje u rezistenciji na amikacin i paromomicin (Vila i Pachon, 2008). Rezistencija *A. baumannii* na hloramfenikol ostvaruje se genima koji se nalaze u okviru intergona, a osim gena za efluksne pumpe (npr. *cmlA* gen) detektovan je i *cat* gen koji kodira hloramfenikol-modifikujuće enzime (Poirel i sar., 2011).

A. baumannii poseduje hloramfenikol O-acetiltransferaznu aktivnost, odnosno enzim hloramfenikol aciltransferaza ispoljava katalitičku aktivnost na hloramfenikol i acetil-CoA, pri čemu nastaju koenzim A (CoA) i hloramfenikol 3-acetat (<http://www.uniprot.org/uniprot/P62579>).

Još jedan mehanizam rezistencije koji je dobro opisan kod *A. baumannii* sojeva je modifikacija ciljnih molekula. Otpornost *A. baumannii* na β -laktamske antibiotike se ostvaruje i procesom modifikacije proteina, koji učestvuju u vezivanju penicilina unutar bakterijske ćelije (*Penicilin Binding Proteins*-PBP). Rezultat ovih modifikacija su PBP proteini sa niskim afinitetom za penicilin. Osim PBP, česti ciljni molekuli ovakvih modifikacija su DNK giraza (topoizomeraza II) i topoizomeraza IV. Za ove enzime se specifično vezuju antibiotici iz grupe hinolona. DNK giraza i topoizomeraza IV su tetramerni enzimi, sačinjeni od dve subjedinice A i dve subjedinice B. Subjedinice DNK giraze su kodirani genima *gyrA* i *gyrB*, a subjedinice topoizomeraze IV genima *parC* i *parE*. Kombinacija mutacija gena *gyrA* i *parC* dovode do promene u redosledu aminokiselina, odnosno promene konfiguracije sintetisanih enzima. Rezistencija *A. baumannii* na fluorohinolone i rifampicin je primarno regulisana strukturnim modifikacijama sličnih nestrukturnih gena (DNK giraze, topoizomeraze IV i β -subjedinice RNK polimeraze), ili sekundarno mutacijama u odgovarajućim regionima odgovornim za rezistenciju (Vila i sar., 1997; Vila i sar., 1995). Mutacije u sekvencama ovih gena ometaju vezivanje hinolona za ciljno mesto. Takođe, *A. baumannii* poseduje sposobnost modifikacije svojih lipopolisaharida procesima acidifikacije i acilovanja, modifikacije lipida A, što dovodi do rezistencije na ove antibiotike, koji predstavljaju poslednju opciju za tretman infekcija izazvanih ovom bakterijskom vrstom (Peterson i sar., 1987).

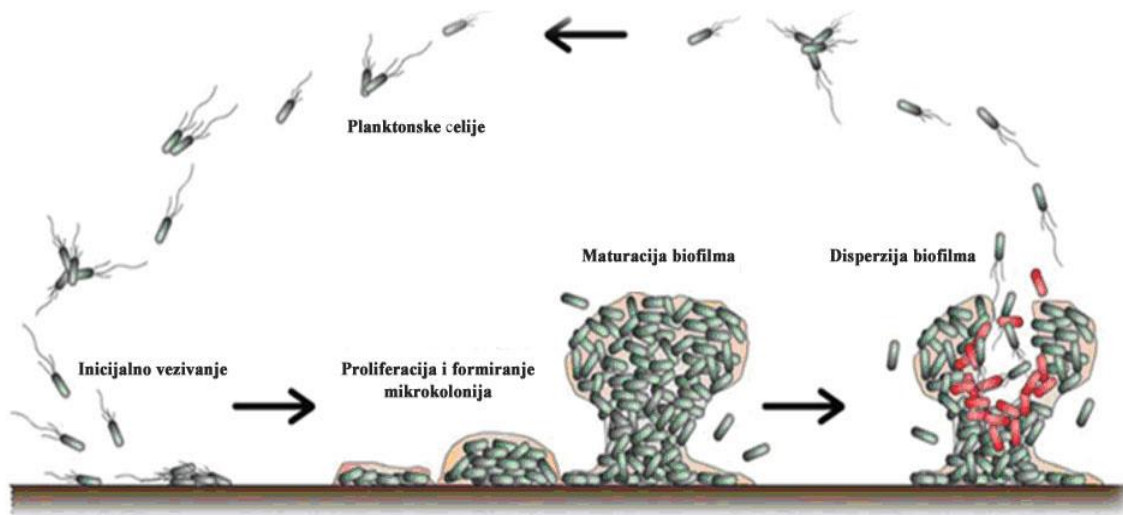
Pored ova četiri najčešća mehanizma rezistencije, kod *A. baumannii* sojeva detektovani su i drugi mehanizmi, kao što su višestruke mutacije u okviru 30S subjedinice metilacijom 16S rRNK, čime se postiže rezistencija na aminoglikozide. *A. baumannii* poseduje i gen *tetM* koji kodira sintezu proteina, koji štiti ribozom od vezivanja za tetracikline (Ribera i sar., 2003). Bitno je napomenuti i da su mutacije na PmrA/PmrB dvokomponentnom regulatornom sistemu čija je uloga remodelovanje omotača Gram negativnih bakterija, odnosno mutacije u genima *pmrA* i *pmrB*, odgovorne za rezistenciju na polimiksine.

Imajući u vidu kompleksnu prirodu ovog mikroorganizma, višestruki mehanizmi često rade u sprezi proizvodeći isti fenotip (Bou i sar., 2000; Fernandez-Cuenca i sar., 2003). Opisani mehanizmi rezistencije doprinose opštoj otpornosti *A. baumannii* koja varira u zavisnosti od soja. Činjenica da multiplo rezistentni sojevi mogu posedovati veći broj različitih mehanizama rezistencije za jednu klasu antibiotika, otežava nalaženje odgovarajuće terapije.

Još jedan od razloga ograničenog broja trenutno dostupnih antimikrobnih agenasa efikasnih u eradikaciji *A. baumannii* infekcija je taj što većina antibiotika deluje na planktonske bakterijske ćelije, a bakterije u prirodnoj sredini veoma često žive u okviru

biofilma i tako dodatno obezbeđuju fenotipsku rezistenciju na konvencionalne antibiotike. Biofilm je sesilna bakterijska zajednica, koju karakterišu ćelije koje su vezane za određenu površinu i uronjene u matriks, koji se sastoji od ekstracelularnih polimernih substanci, prvenstveno egzopolisaharida i ekstracelularne DNK (eDNA), koje su poreklom od samih ćelija (Mhamedi i sar., 2014). Ćelije u biofilmu se razlikuju od planktonskih ćelija po eksprimiranim genima, odnosno proteinima, što dovodi do morfoloških, fizioloških i fenotipskih razlika (Tomaras i sar., 2003; Nicholson i sar., 2012). Proces formiranja biofilma se odvija kroz nekoliko faza (slika 2.3), koje uključuju:

- inicijalno pričvršćivanje bakterije za površinu, odnosno stadijume reverzibilnog i ireverzibilnog vezivanja,
- umnožavanje bakterija i formiranje mikrokolonija,
- sazrevanje (maturacija) biofilma, odnosno razvoj strukture biofilma gde su bakterijske ćelije uronjene u ekstracelularne polimerne supstance (EPS),
- formiranje trodimenzionalne strukture zrelog biofilma i odvajanje delova zrelog biofilma (Tomaras i sar., 2003).



Slika 2.3. Proces formiranja biofilma (preuzeto iz McDougald i sar., 2008)

Formiranje biofilmova počinje interakcijom planktonskih ćelija sa površinom kao rezultat različitih signala između ćelija (O'Toole i Kolter, 1998). Utvrđeno je da kod velike većine pokretnih bakterija inicijalno vezivanje ćelija za površinu zavisi od pokretljivosti ćelija pomoću flagela (Romeo, 2008). Clemmer i sar. (2011) su analizirali pokretljivost *A. baumannii*, uključujući i identifikaciju gena koji su potrebni za ovaj proces. Analizom sekvence genoma *A. baumannii* je utvrđeno da su geni za flagele odsutni, a pokretljivost *A. baumannii* soja zavisila je od funkcionalnosti *pilT* gena. Trzajuće kretanje, odnosno kretanje pomoću pila tipa IV, predstavlja značajnu komponentu ukupnog kretanja *A. baumannii* (Clemmer i sar., 2011). Kod nekih Gram negativnih bakterija formiranje mikrokolonija i

finalna trodimenzionalna arhitektura zrelog biofilma zavise od sposobnosti ćelija da se kreću na različitim površinama pomoću pila tipa IV (Romeo, 2008). Generalno, vezivanje ćelija se najlakše odvija na površinama koje su hrapave i hidrofobne (Donlan, 2002). Hidrofobnost ćelija je povezana sa pojavom autoagregacije ćelija, koja predstavlja sposobnost da se ćelije iste vrste povezuju u suspenziji i uglavnom su hidrofobnije ćelije sklonije autoagregaciji. U skladu sa tim povećan stepen autoagregacije dovodi do povećane produkcije biofilma (Romeo, 2008).

Elektronskom i fluorescentnom mikroskopijom je pokazana još jedna uloga pila tipa IV, kao i egzopolisaharida, a to je učešće ove strukture kod *A. baumannii* u formiranju ćelijskih agregata odnosno mikrokolonija (Tomaras i sar., 2003). Bakterija počinje da luči ekstracelularne polimerne supstance (EPS), koje imaju ulogu u zaštiti ćelija u okviru mikrokolonija (Rickard i sar., 2004). Egzopolisaharidi su visoko hidrirani i tako sprečavaju smrtonosno isušivanje ćelija unutar biofilma, a to pokazuje da klinički izolati *A. baumannii* koji proizvode biofilm mogu preživeti duže na suvim površinama od onih izolata koji ne formiraju biofilm (Espinal i sar., 2012). Ekstracelularni matriks deluje i kao zaštitni sloj i stvara optimalno okruženje za razmenu genetskog materijala između različitih mikroorganizama (Marti i sar., 2011). Kako se heterogenost biofilma povećava, menjaju se hemijske i fizičke karakteristike kao što su: smanjenje količine nutritijenata, smanjenje dostupnog kiseonika, akumulacija otpadnih produkata, starenje ćelija i ćelijska smrt. Bakterije sa površine biofilma imaju fiziološki status sličan planktonskim ćelijama, dok ćelije u dubljim slojevima su u nepovoljnim uslovima i metabolički su manje aktivne. Utvrđeno je da *A. baumannii* ima veću sposobnost da formira biofilm na dodiru vazduh-tečnost u poređenju sa drugim *Acinetobacter* vrstama (Marti i sar., 2011).

Pored već pomenutih karakteristika bakterije *A. baumannii* različiti proteini imaju važnu ulogu u procesu formiranja biofilma. Pokazano je da protein Bap igra važnu ulogu u određenim fazama ovog kompleksnog procesa, kao što su adhezija, sazrevanje i održavanje strukture biofilma genovrste *Acinetobacter baumannii*. Produkcija Bap proteina je povezana sa početnom adherencijom za abiotičke površine. Takođe, sugeriše se da Bap protein može imati važnu ulogu i u kolonizaciji domaćina, a utvrđeno je i da ovaj protein utiče na hidrofobnost ćelije i formiranje biofilma na medicinskim površinama (Brossard i Campagnari, 2011). Bap protein kod *A. baumannii* je i od suštinskog značaja za stabilizaciju zrelog biofilma na staklu, utičući na debljinu i biovolumen. Iz navedenih razloga ovaj protein je kod *A. baumannii* ključni faktor u formiranju biofilma i na taj način može imati ulogu u rezistenciji i perzistenciji ove bakterije kako u bolničkom okruženju, tako i u infekcijama. Glavnu komponentu biofilma *A. baumannii* predstavlja i poli- β -(1-6) N acetilglikozamin (PNAG), koji je prvi put opisan kod *Staphylococcus* spp. (Prashanth i sar., 2012). PgaABCD lokus kodira proteine koji sintetišu PNAG, koji utiče na kolonizaciju, virulentnost i obezbeđuje zaštitu bakterije od antibiotika (Choi i sar., 2009). Osim adhezivne uloge Bap proteina i PANG, Lee i sar. (2008) su pokazali da je adhezija *A. baumannii* na biotičkim

površinama, kao što su bronhijalne epitelijalne ćelije i na plastične površine poboljšana u prisustvu, odnosno ekspresijom *bla_{PER-1}* gena, koji kodira već pomenuti PER-1 tip β -laktamaza (Lee i sar., 2008). Utvrđeno je da izolati koji poseduju ovaj gen mogu da formiraju kvalitetniji biofilm u poređenju sa izolatima koji ne poseduju ovaj gen (Longo i sar., 2014). Pored ovih proteina, važnu ulogu u procesu formiranja biofilma imaju i lektini. Lektini su proteini koji na svojim površinama imaju dva ili više mesta za vezivanje ugljenih hidrata (Patil i sar., 2001). Bakterijski lektini poseduju hemaglutinaznu aktivnost, ali je njihova osnovna funkcija olakšavanje vezivanja bakterije za ćeliju domaćina, što je preduslov za kolonizaciju bakterije i nastajanje infekcije. Iz tog razloga, bakterijski lektini se često nazivaju adhezini, dok se ugljeni hidrati na površini ćelije domaćina nazivaju receptori (Varki i sar., 2009). Bakterijski lektini se obično javljaju u obliku membranskih proteina ili češće u obliku izduženih nastavaka (fimbrije i pili) i stupaju u kontakt sa glikoproteinima i glikolipidima na ćeliji domaćina (Varki i sar., 2009). Bitno je istaći da se proteini velikih molekularnih masa, kao što su Bap protein i lektini, nalaze na površini ćelije i imaju značajnu ulogu u međucelijskoj adheziji, kao i ulogu u sazrevanju biofilma i virulentnosti (Prashanth i sar., 2012).

Kao posledica povećanja broja bakterijskih ćelija, odnosno povećanje gustine ćelija, dolazi do regulacije ekspresije gena u biofilmu poznate pod nazivom *quorum sensing*. *Quorum sensing* je široko rasprostranjen regulatorni mehanizam bakterijama i među Gram negativnim se odvija pomoću acil-homoserin laktona (AHL) (Tay i Yew, 2013). Ćelije u biofilmu međusobno komuniciraju putem produkata koji su u stanju da difunduju iz jedne ćelije u drugu (Roca i sar., 2012). Ovi produkti se nazivaju autoinduceri, jer kada su u bakterijskoj populaciji prisutni u graničnim koncentracijama signaliziraju gensku ekspresiju kod bakterija koje su ih proizvele. Autoinduceri regulišu različite fiziološke procese (simbioza, virulencija, konjugacija, sporulacija, kretanje itd.), uključujući i biofilm (Miller i Bassler, 2001), a od posebnog su značaja u fazi odvajanja ćelija od biofilma.

Još jedna od veoma bitnih karakteristika bakterijskih populacija koje se nalaze u okviru biofilma jeste postojanje metabolički neaktivnih ćelija perzistera, koje ispoljavaju toleranciju na veliki broj antimikrobnih agenasa (Lewis, 2008). Ove ćelije ne rastu, niti umiru u prisustvu baktericidnih agenasa, i na taj način ispoljavaju multiplu toleranciju (Lewis, 2005). Ćelije perzisteri ne nastaju u određenoj fazi ćelijskog ciklusa, niti su to defektne ćelije ili ćelije koje su nastale kao odgovor na antibiotike. Podaci ukazuju da su perzisteri specijalizovane ćelije smanjene metaboličke aktivnosti, koje obnavljaju biofilm (Keren i sar., 2004).

Formiranje biofilma omogućuje veći transfer gena između bakterija, uključujući i gene za otpornost na antibiotike, tako da su bakterije u biofilmu i do 1000 puta otpornije na antimikrobne agense i smatraju se multiplo- ili pan-rezistentnim. Osim povećanog transfera gena, ostali mehanizmi rezistencije bakterija u biofilmu su neutralisanje antimikrobnih agenasa od strane matriksa biofilma, sprečavanje prodiranja agenasa u dublje slojeve biofilma (tj.

smanjena propustljivost matriksa), produkcija enzima za razgradnju antimikrobnih agenasa, kao i smanjena metabolička aktivnost bakterijskih ćelija u okviru biofilma. Sposobnost patogena da kolonizuje razne površine i da stvara biofilm je glavni faktor virulencije i korelira sa porastom rezistencije na antibiotike (Prashanth i sar., 2012). Upravo potencijal genovrste *Acinetobacter baumannii* da formira biofilm može da objasni njegovu izvanrednu otpornost na antibiotike (Tomaras i sar., 2003). Ova bakterija poseduje sposobnost formiranja biofilma na biotičkim površinama, kao što su rane, tkiva pluća obolelih od cistične fibroze, i na abiotičkim površinama, pre svega na medicinskim uređajima i opremi, kao što su kateteri, endotrahealna cevi i drugim predmetima (Prashanth i sar., 2012). Biofilmovi na površini medicinskih implantata mogu poticati od bakterija koje dospevaju sa kože ili sluzokože pacijenta tokom implantacije, ali takođe mogu da potiču i sa ruku bolničkog osoblja. Privremeno implantirani vaskularni kateter ili endotrahealna tuba mogu da postanu mesto bakterijske adhezije i formiranja biofilma, a time i rezervoar infekcije (Mhamedi i sar., 2014). Nedavna istraživanja ukazuju na to da mnoge hronično inficirane rane na površini kože (~60%) sadrže bakterijske biofilme, što ukazuje na činjenicu da biofilmovi igraju bitnu ulogu u održavanju hroničnog inflamatornog stanja koje na kraju dovodi do sprečavanja zarastanja rane na površini kože (Phillips i sar., 2008). Zarastanje rane postaje kompleksnije i komplikovanije kod osoba koje imaju i druge zdravstvene probleme, a koje su pogođene vrstom *A. baumannii* kao oportunističkim patogenom, tako da je u nekim slučajevima zarastanje rana značajno prolongirano. Agregacije mikrokolonija bakterijskog biofilma koje se nalaze vezane za površinu rane, u poređenju sa planktonskim (slobodno plivajućim) bakterijama, poseduju povećanu otpornost na endogena antitela i ćelije fagocita, kao i egzogenih antibiotika i antiseptika. *A. baumannii* poseduje sposobnost formiranja zajednice, tj. biofilma kada je u mogućnosti da se asocira sa površinom kao što je otvorena rana (Dallo i Weita, 2010). Diverzitet vrsta koji se nalazi u rani je često tri puta veći nego što pokazuju standardni rezultati dobijeni kultivacijom uzoraka rane. Ova bakterijska zajednica je izuzetno kompleksna, međutim neke bakterijske vrste, kao što je npr. *A. baumannii*, su dominantnije u ovakvoj zajednici u odnosu na ostale prisutne vrste (Guerrero i sar., 2010; Dallo i Weita, 2010). Iz tog razloga bakterijski biofilmovi formirani u ranama mogu predstavljati objašnjenje za produženo vreme zaceljivanja, kao i za patofiziologiju nezarastajućih rana (Nwomeh i sar., 1998).

Usled svih navedenih karakteristika genomske vrste *A. baumannii* od kojih je većina upravo odgovorna za izraženu rezistenciju ove bakterije na veliki broj različitih antimikrobnih agenasa, aktuelna istraživanja su usmerena na pronalaženje nekonvencionalnih anti-*A. baumannii* agenasa, posebno onih prirodnog porekla.

2.3. NEKONVENCIONALNI ANTIMIKROBNI AGENSI

Usled visokog stepena rezistencije bakterija na konvencionalne antibiotike, neprestano se traga za novim alternativnim agensima i razvijaju se strategije za prevazilaženje ovog problema. Kontrola multiplo rezistentnih sojeva primenom konvencionalnih antibiotika podrazumeva nekoliko mogućnosti. Kada je uzročnik infekcije multiplo rezistentna bakterija ređe se primenjuje monoterapija (terapija jednim antibiotikom). Najefikasnija je terapija kombinacijom dva ili više antibiotika i to onih sa sinergističkim delovanjem. Ovakve kombinacije načešće uključuju novije generacije antibiotika (npr. imipenem za Gram negativne nefermentišuće bakterije), ili pak starije, koji su bili izbegavani poslednjih decenija zbog potencijalne toksičnosti (npr. polimiksin B) (Knežević, 2009; Knežević, 2012). Sinergistička aktivnost je utvrđena kod sledećih kombinacija antibiotika: kolistin/imipenem, meropenem/ciprofloksacin, amikacin/karbapenem, kolistin/ceftazidim, cefepim/amikacin, aztreonam/amikacin/ceftazidim, i dr. Kombinacije dva ili više antibiotika poseduju prednosti koje se ogledaju u boljem terapijskom efektu antibiotika u kombinaciji, smanjenoj učestalosti pojave mutanata rezistentnih na jedno od primenjenih terapijskih sredstava i mogućoj primeni nižih koncentracija antibiotika tokom terapije (Knežević, 2012). Međutim, ovakve kombinacije ne predstavljaju trajno rešenje zbog činjenice da već dugi niz godina nisu otkrivene nove klase antibiotika efikasne protiv Gram negativnih bakterija. Najčešća je modifikacija postojećih antibiotika u cilju povećanja njihove efikasnosti, ali detektovana je rezistencija bakterija i na ove modifikovane agense. Ovakva situacija zahteva intenziviranje potrage za alternativnim antimikrobnim agensima. Kao potencijalni izvor bioaktivnih supstanci proučavaju se bakteriofagi, ekstrakti algi, gljiva i lišajeva, antimikrobni peptidi životinja (najčešće invertebrata) itd. Osim pomenutih nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa, veliku pažnju privlače biljke kao potencijalni izvor jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću. Najčešći predmet istraživanja su etarska ulja i biljni ekstrakti, kao i njihove bioaktivne komponente.

2.3.1. DOSADAŠNJA PRIMENA PRIRODNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA I NJIHOVIH BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENTI

U prirodi postoji veliki broj antimikrobnih agenasa koji igraju veoma važnu ulogu u zaštiti biljaka delujući kao antibakterijski, antivirusni, antifungalni agensi i insekticidi. Produkcijom aromatičnih jedinjenja biljke odbijaju herbivore ili privlače neke insekte u cilju povećanja rasejavanja polena i semena (Bakkali i sar., 2008). Lekovita svojstva biljaka ljudi koriste od davnina, a otkrivena su sasvim slučajno; dok je čovek tragao za hranom, zapazio je

da se životinje, kada su povređene ili bolesne, hrane pojedinim biljkama, što je pomoglo primitivnom čoveku da pronade lek i za svoje bolesti. Razvojem društva i pismenosti podaci o upotrebi lekovitih biljaka i njihovih produkata su zabeleženi i sačuvani. Prvi zapisi o njihovoj upotrebi datiraju još od davnina i pronađeni su u ranim egipatskim i azijskim kulturama.

Egipćani su među prvima intenzivno koristili etarska ulja u medicinskoj praksi, u tretmanima lepote, pripremi hrane, za balzamovanje i u religioznim obredima. Timijan, sandalovina, smola i cimet su u to vreme smatrani veoma vrednom robom duž trgovačkih puteva karavna i čak su menjani za zlato. Egipćani su posedovali solidna znanja o biljkama, upravo zahvaljujući razvijenoj tehnici balzamovanja. Dokument *Ebers Papyrus* (oko 1550. godine pre n.e.) opisuje blizu hiljadu biljnih droga sa recepturama za pripremu različitih preparata, praškova, aromatičnih i etarskih ulja i dr. Mnoge od ovih droga i danas se koriste u fitoterapiji i oficinalnoj medicini (Capasso i sar., 2003). Prvi podaci o upotrebi etarskih ulja u terapeutske svrhe pronađeni su upravo u dokumentu *Ebers Papyrus*, koji je sadržao spisak 877 lekova i tretmana na bazi etarskih ulja. Iz ovog dokumenta se vidi da je mirisna smola bila omiljeni sastojak, koji je često mešan sa medom i biljakama, zbog sposobnosti da inhibira bakterijski rast.

Znanja o dejstvu lekovitih biljaka su se prenela u Grčku i druge zapadne zemlje starog veka. Zbog svojih lekovitih i mirisnih svojstava posebna pažnja bila je usmerena na primenu etarskih ulja. Grci su po ugledu na Egipćane, široko primenjivali blagotvorna svojstva etarskih ulja, a aromaterapiju koristili za poboljšanje fizičkih i mentalnih funkcija. Rimljani su koristili aromatične biljke za ukrašavanje prostorija, a etarska ulja za masaže, negu i ličnu higijenu. Pod uticajem Grka i Rimljana, ali i zbog upotrebe aromatičnih biljaka u Kini i Indiji, Persijanci su počeli da unapređuju metode destilacije za dobijanje etarskih ulja iz aromatičnih biljaka. Mnogi značajni ljudi iz tog perioda opisali su biljke i lekovita svojstva biljaka, koje su korišćene kao lek. Među njima su Hipokrat (460-370 pre n.e.), Teofrast (370-287 pre n.e.), Plinije Stariji (23-79 n.e.), Dioskorid (40-80 n.e.) i Galen (130-210 n.e.) (Capasso i sar., 2003). Grčki lekar i botaničar, Dioskorid je u svojoj studiji *De Materia Medica* (termin se vekovima koristi za definiciju nauke o lekovima) prikupio i zabeležio veoma precizne informacije za oko 600 biljaka i lekovitih sredstava tog doba. Takođe, Galen, rimski lekar i filozof i veliki poznavalac lekovitih biljaka, predložio je naučne metode za utvrđivanje svojstava i upotrebe svakog lekovitog sredstva. Zbog antibakterijskih i aromatičnih osobina, etarska ulja su korišćena i u srednjem veku u Evropi, a najviše su ih koristili Arapi koji su razvili metod hidrodestilacije. Etarska ulja su dobijana iz različitih aromatičnih biljaka koja su važan deo tradicionalne farmakopeje zemalja umerenog i toplog pojasa, kao što je Mediteran i tropske zemlje (Cowan i sar, 1999; Dorman i Deans, 2000; Burt i sar., 2004; Bakkali i sar., 2008). Termin „etarsko ulje“ prvi put je upotrebljen u XVI veku od strane Paraceleus von Hohenheima, koji je pod tim terminom podrazumevao efektivne komponente leka „Quinta essential“ (Guenther, 1950). Etarska ulja su poznata po

svojim antiseptičnim osobinama, odnosno baktericidnoj, virucidnoj i fungicidnoj aktivnosti, zatim svojim lekovitim svojstvima i mirisu, a koristila su se za konzervaciju hrane, kao antimikrobni agensi, kao analgetici, sedativi, antiinflamatorne supstance, spazmolitici i kao lekovi za lokalnu anesteziju (Burt i sar., 2004; Bakkali i sar., 2008; Bowles, 2003). Tokom 18. i 19. veka najčešće korišćeni oblici biljnih droga bili su praškovi, čajevi i tinkture. O njihovom sastavu i aktivnim komponentama nije bilo naučnih podataka. Međutim, u ovom periodu započeta su ozbiljnija hemijska istraživanja i izolovana su i identifikovana prva farmakološki aktivna jedinjenja. Tako je na primer 1803. godine izolovan morfin, strihnin je izolovan 1817., kinin i kofein 1820., nikotin 1828., atropin 1833., a kokain 1855. godine (Capasso i sar., 2003). Danas su izolovane komponente velikog broja biljaka sa lekovitim svojstvima čija je struktura definisana. Prema nekim podacima prvi eksperiment o baktericidnom dejstvu etarskih ulja izveden je 1881. godine od strane de la Croix (Boyle, 1955), a moćna lekovita i isceljujuća svojstva etarskih ulja su ponovo otkrivena 1937. godine od strane francuskog hemičara Rene Maurice Gattefosse, koji je nakon eksplozije u svojoj laboratoriji zadobio teške opekotine ruku i uspešno ih izlečio čistim uljem lavande. Njegov savremenik, takođe Francuz, dr Jean Valnet je koristeći čista etarska ulja uspešno lečio povredene vojnike tokom Drugog svetskog rata. Dr Valent je postao svetski lider u razvoju aromaterapijske prakse (Bakkali i sar., 2008). Primena etarskih ulja je nastavila da raste sa napretkom istraživanja naučnika i lekara i potvrđivanjem brojnih farmakoloških aktivnosti etarskih ulja. Otkriće antibiotika 20-ih godina prošlog veka kao najefikasnijih antimikrobnih agenasa, dovelo je do smanjenja interesovanja za ostale antimikrobne agense koji su do tada intenzivno proučavani (bakteriofagi, etarska ulja, biljni ekstrakti, itd.). Takođe, sa početkom antibiotske ere i porastom primene etarskih ulja kao aroma i mirisa, njihova primena u medicini i lečenju postepeno je opadala, a istraživanja u oblasti skrininga antimikrobne aktivnosti prirodnih produkata su bila zapostavljena i skoro u potpunosti napuštena. Međutim, s obzirom da sintetski antibiotici imaju brojne neželjene efekte i da bakterije velikom brzinom razvijaju rezistenciju, danas se u svetu sve više koriste biljni antibiotici, te je eksploatacija prirodnih proizvoda u medicinske svrhe u procvatu. Do danas, razvijene su različite metode za ekstrakciju etarskih ulja, a došlo se i do novih saznanja o njihovom mehanizmu delovanja i mogućnostima upotrebe, naročito na nivou antimikrobnog delovanja.

Danas postoje brojne studije koje se bave ispitivanjem primene nekonvencionalnih agenasa i antimikrobnih efekata koje ovi prirodni agensi ostvaruju u cilju poboljšanja kvaliteta života ljudi. Jedna od prvih rigoroznih kliničkih studija ocenila je efikasnost 5 % etarskog ulja *Melaluca alternifolia* u poređenju sa 5 % benzoil-peroksidom u lečenju akni (Bassett i sar., 1990). Oba tretmana su dovela do smanjenja upale lezija, ali je tretman etarskim uljem pokazao značajno manje perutanja, svraba i isušivanja kože, a takođe je prijavljeno i značajno manje sporednih efekata (27 od 61 pacijenata), u odnosu na tretman benzoil-peroksidom (50 od 63 pacijenata) (Bassett i sar., 1990). U drugoj studiji testirana je efikasnost tečnosti za ispiranje usta na bazi etarskog ulja takođe vrste *M. alternifolia* na

oralne mikrobionte 40 dobrovoljaca i pokazala da je primena tečnosti za ispiranje usta sa etarskim uljem jednom dnevno u toku sedam dana dovela do redukcije brojnosti *Streptococcus mutans*, ali i ukupne brojnosti oralnih bakterija u poređenju sa placebo tretmanom. Dobijeni podaci su takođe dokazali da se detektovana redukcija bakterijske brojnosti održala dve nedelje nakon prestanka primene ovog sredstva (Groppo i sar., 2002). Osim toga, u jednoj studiji je formulacija na bazi etarskog ulja eukaliptusa aplicirana perkutano u kost u cilju lečenja MRSA infekcije donje tibije, što je rezultovalo izlečenjem (Sherry i sar., 2001). Takođe, pokazano je da etarska ulja pomažu u lečenju malignih čireva neprijatnog mirisa, a lokalna/topikalna primena etarskih ulja eukaliptusa i čajevog drveta na ulceracije nastale usled karcinoma u predelu vrata i glave rezultovala je zarastanjem čireva, re-epitalizacijom i nestankom neprijatnog mirisa (Warnke i sar., 2005). U ispitivanju efekta etarskih ulja iz Turske na zarastanje rana dokazano je da su kreme sa etarskim uljima *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* i *J. phoenicea* L. ispoljile najbolji efekat na zarastanje rana u odnosu na kreme sa etarskim uljima vrsta *Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Mill.) Aiton, *Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis*, *Juniperus communis* L. subsp. *nana* Syme., *Juniperus excelsa* Bieb. i *Juniperus foetidissima* Willd. (Tumen i sar., 2011).

Zbog svojih osobina koje su još od davnina primećene u prirodi i tradicionalne primene u mnogim kulturama, kao i brojnih dokaza o njihovoj efikasnosti u lečenju različitih bolesti, etarska ulja i biljni ekstrakti se danas koriste u velikoj meri. Razlozi za vraćanje prirodi i njenim agensima su sve češća pojava i širenje multplo i pan-rezistentnih mikroorganizama, ali i razvoj ekološke svesti stanovništva. Danas je poznato oko 3000 različitih etarskih ulja od kojih 300 imaju izuzetan komercijalni značaj u farmaceutskoj, poljoprivrednoj, prehrambenoj, sanitarnoj, kozmetičkoj industriji i industriji parfema (Bakkali i sar., 2008). Na primer, komponente etarskih ulja, d-limonen, geranil acetat ili d-karvon koriste se u proizvodnji parfema, krema, sapuna, kao poboljšivači arome hrane, kao mirisi u proizvodima za čišćenje domaćinstva i kao rastvarači u industriji (Burt, 2004; Cowan, 1999). Etarska ulja takođe nalaze primenu u aromaterapiji, zatim kao komponente kupki i ulja za masažu. Neka etarska ulja poseduju naročito lekovita svojstva i za njih postoje tvrdnje da leče disfunkcionalne organe ili sistemske poremećaje (Silva i sar., 2003; Hajhashemi i sar., 2003; Perry i sar., 2003). Biljni ekstrakti takođe imaju široku upotrebu (tabela 2.3).

Tabela 2.3. Biljni lekovi odobreni od strane nemačke komisije E (Blumenthal i sar., 1998) za lečenje određenih oboljenja kod ljudi

Sistem organa	Oboljenje	Biljna vrsta	Deo biljke	Dnevna doza biljnog leka*	Referenca
Nervni sistem	Anksioznost i nesаница	<i>Melissa officinalis</i> – matičnjak	list	1,5-4,5 g droge	Beauburn i Gray, 2000; Capasso i sar., 2003
		<i>Valeriana officinalis</i> – odoljen	koren	2-3 g sirove droge u čaju 2-3 puta	
		<i>Lavandula angustifolia</i> – lavanda	cvet	20-80 mg ulja sa kockom šećera	
	Depresija	<i>Matricaria chamomilla</i> – kamilica	cvast	5 g osušenih cvetova	
		<i>Humulus lupulus</i> – hmelj	šišarice	1-2 g suvih šišarica	
		<i>Pasiflora incarnata</i> – parsiflora	nadzemni delovi	3 g droge	
Kardiovaskularni sistem	Kongestivna srčana insuficijencija	<i>Hypericum perforatum</i> – kantarion	nadzemni delovi	1-2 g droge	Miller, 1998; Wang i Ng, 1999; Capasso i sar., 2003; Canter i Ernst, 2002
		<i>Crataegus laevigata</i> – glog	cvet, list, plod	5 g sirove droge ili 160-900 mg alkoholnog ekstrakta	
		<i>Adonis vernalis</i> – gorocvet	nadzemni delovi	1-3 g droge	
		<i>Convallaria majalis</i> – đurđevak	nadzemni delovi	0,15 g droge	
		<i>Urginea maritima</i> – morski luk	lukovica	0,1-0,5 g droge	
	Angina pektoris	<i>Panax ginseng</i> – ginseng	osušen koren	-	
		<i>Salvia miltiorrhiza</i> – kineska žalfija	nadzemni delovi	-	
		Hipertenzija	<i>Allium sativum</i> – beli luk	lukovica	
	<i>Allium cepa</i> – crni luk		lukovica	20 g	
	<i>Rauwolfia serpentina</i> – zmijin koren		koren	600 mg droge	
	Okluzivno oboljenje arterija	<i>Ginkgo biloba</i> – ginko	list	40 mg ekstrakta	
	Hronična venska insuficijencija	<i>Aesculus hippocastanum</i> – divlji kesten	seme	35-150 mg escina	
		<i>Ruscus aculeatus</i> – kostrika	koren, rizom	300-600 mg ekstrakta	
		<i>Hamamelis virginiana</i> – hamamelis	list, kora	5-10 g sirove droge	
	Hemoroidi	<i>Ruscus aculeatus</i> – kostrika	koren, rizom	600 mg ekstrakta	
<i>Aesculus hippocastanum</i> – divlji kesten		seme	40-150 mg escina		
<i>Populus alba, P. nigra, P. tremula</i> – topole		kora i list	10 g suve droge		
Metabolizam	Poremećaj metabolizma lipida	<i>Allium sativum</i> – beli luk	lukovica	4 g svežeg belog luka ili 0,25 mg/kg telesne težine etarskog ulja ili 10 mg ulja destilovanog vodenom parom	Wang i Ng, 1999; Capasso i sar., 2003; Thomson Coon i Ernst, 2003

	Gojaznost Dijabetes melitus	<i>Glycine max</i> – soja <i>Ephedra sinica</i> – kineska efedra <i>Aloe vera</i> – aloja <i>Cynara scolymus</i> – artičoka <i>Allium sativum</i> – beli luk	zrno nadzemni delovi list list lukovica	3,5 g fosfolipida 15-30 mg ukupnih alkaloida 0,1-0,2 g droge 4-9 g droge 4 g droge	
Renalni sistem	Infekcije urinarnog sistema	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> – planika <i>Vaccinium macrocarpon</i> – brusnica	list plod	3 g suve droge 600-800 mg standardizovanog ekstrakta	Newton i sar., 2001; Capasso i sar., 2003;
	Diuretici	<i>Barosma betulina</i> – buhu <i>Equisetum arvense</i> – rastavić <i>Betula</i> spp. – breza <i>Urtica dioica</i> – kopriva	list nadzemni delovi list biljka u fazi cvetanja, koren	3-6 g suve droge 6 g suve droge 2-3 g suve droge 8-12 g droge	
	Kamen u bubregu	<i>Betula</i> spp. – breza <i>Equisetum arvense</i> – rastavić <i>Petroselinum crispum</i> – peršun <i>Urtica dioica</i> – kopriva <i>Phaseolus vulgaris</i> – pasulj	list nadzemni delovi stabljika, koren, plod biljka u fazi cvetanja, koren mahuna	2-3 g suve droge 6 g suve droge 6 g 8-12 g 5-15 g	
Imuni sistem	Inflamatorna oboljenja	<i>Betula</i> spp. – breza <i>Eucalyptus globulus</i> – eukaliptus <i>Viscum album</i> – bela imela <i>Cinnamomum camphora</i> – kamfor <i>Capsicum annuum</i> – ljuta paprika <i>Rosmarinus officinalis</i> – ruzmarin <i>Urtica dioica</i> – kopriva <i>Salix</i> spp. – vrba <i>Petasites hybridus</i> – lopuh <i>Tanacetum parthenium</i> – popadija <i>Melissa officinalis</i> – matičnjak	list list (ulje) list, grana stablo drveta (ulje) plod list (ulje) cvetni delovi kora list nadzemni delovi list	6-9 g suve droge 0,3-0,6 g 10 g spoljna upotreba spoljna upotreba spoljna upotreba 8-12 g sirove droge 5-10 g sirove droge 4-7 g 0,25 g osušene droge 1,5-4,5 g	Capasso i sar., 2003; Ernst, 2003; Ernst i Chrubasik, 2000
Respiratorni sistem	Bronhijalna astma	<i>Ginkgo biloba</i> – ginko <i>Hedera helix</i> – bršljan <i>Artemisia argyi</i> – kineski pelen <i>Atropa belladonna</i> – velebilje <i>Thymus vulgaris</i> – timijan <i>Primula veris</i> – jagorčevina	list list list (ulje) list list, cvetni vrhovi cvet	3-6 g 0,3-0,8 g suvi ekstrakt 0,1-0,2 ml ulja 0,2-0,4 g 10 g 3 g	Capasso i sar., 2003; Pinn, 2001; Ziment, 2000;
	Bronhitis (i kašalj)				

		<i>Hedera helix</i> – bršljan	list	0,3-0,8 g	
		<i>Eucalyptus globulus</i> – eukaliptus	list (ulje)	inhalacija	
		<i>Thymus vulgaris</i> – timijan	herba (ulje)	inhalacija	
		<i>Thymus serpyllum</i> – majčina dušica	list i cvetni vrhovi (ulje)	inhalacija	
	Kašalj (i bronhitis)	<i>Malva sylvestris</i> – crni slez	list, cvet	5 g	
		<i>Althaea officinalis</i> – beli slez	koren	6 g	
		<i>Tussilago farfara</i> – podbel	cvast, list	4,5-6 g	
	Rinitis	<i>Petasites hybridus</i> – lopuh	koren, list	4-7 g	
	Nazeb i grip	<i>Echinacea angustifolia</i> , <i>E. pallida</i> , <i>E. purpurea</i> – ehinacea	koren ili rizom	900 mg sirove droge	
		<i>Andrographis paniculata</i> – andrografis	nadzemni delovi	2-3 g suve biljke ili 5-6 g kao dekoka ili infuz	
Reproduktivni sistem	Premenstrualni sindrom i tegobe u menopauzi	<i>Oenothera biennis</i> – noćurak	seme (neisparljivo ulje)	3-6 g	Dvorkin i Song, 2002; Kang i sar., 2002; Capasso i sar., 2003;
		<i>Vitex agnus-castus</i> – konopljika	plod	0,03-0,04 g biljke	
		<i>Cimicifuga racemosa</i> – cimifuga	koren, rizom	0,04-0,2 g osušene droge	
	Benigna hiperplazija prostate	<i>Urtica dioica</i> – kopriva	koren	4-6 g sirove droge	
		<i>Cucurbita pepo</i> – bundeva	seme	10 g	
		<i>Serenoa repens</i> – testerasta palma	plod	1-2 g sirove droge	
Digestivni sistem	Stomatitis, gingivitis, glositis	<i>Althaea officinalis</i> – beli slez	koren	6 g osušenog korena	Capasso i sar., 2003; Langmead i Rampton, 2001; Borrelli i Izzo, 2000; Thomson Coon i Ernst, 2002;
		<i>Salvia officinalis</i> – žalfija	nadzemni delovi	-	
		<i>Mentha x piperita</i> – menta	nadzemni delovi (ulje)	6-12 kapi ulja	
	Dispepsija	<i>Coriandrum sativum</i> – korijander	plod	3 g droge	
		<i>Lavandula angustifolia</i> – lavanda	cvet	20-80 mg ulja	
		<i>Mentha x piperita</i> – menta	list, list (ulje)	3-6 g droge ili 6-12 kapi ulja	
		<i>Rosmarinus officinalis</i> – ruzmarin	list	4-6 g droge	
		<i>Achillea millefolium</i> – hajdučka trava	nadzemni delovi	3-4,5 g droge	
		<i>Foeniculum vulgare</i> – orač	plod (ulje)	0,1-0,6 ml ulja	
	Nadimanje	<i>Carum carvi</i> – kim	plod	1,5-6 g sirove droge	
		<i>Pimpinella anisum</i> – anis	plod	3 g sirove droge	
		<i>Foeniculum vulgare</i> – orač	plod	0,1-0,6 ml ulja ili 5-7 g sirove droge	
	Gastritis i peptični ulkus	<i>Glycyrrhiza glabra</i> – slatki koren	koren	5-15 g droge	
	Kinetozna	<i>Zingiber officinale</i> – đumbir	rizom	1 g đumbira u prahu	

	Opstipacija	<i>Aloe barbadensis</i> – aloja	list (sok)	0,1-0,2 g droge	
		<i>Rhamnus cathartica</i> – pasdren	plod	2-5 g	
		<i>Linum usitatissimum</i> – lan	seme	1-2 g	
	Dijareja	<i>Vaccinium myrtillus</i> – borovnica	plod	20-50 g	
		<i>Rubus fruticosus</i> – kupina	list	3-6 g	
		<i>Althaea officinalis</i> – beli slez	koren	6 g droge	
	Sindrom prenadraženih creva	<i>Mentha x piperita</i> – pitoma nana	cvetni vrhovi (ulje)	0,2 ml ulja	
Jetra i žučni sistem	Bolesti jetre	<i>Silybum marianum</i> – badelj	seme	12-15 g	Capasso i sar., 2003; Langmead i Rampton, 2001; Luper, 1998; Luper, 1999
	Bolest bilijarnog trakta	<i>Cynara scolymus</i> – artičoka	list	6 g	
		<i>Mentha x piperita</i> – pitoma nana	list, list (ulje)	3-6 g droge ili 0,6 ml ulja	
		<i>Achillea millefolium</i> – hajdučka trava	nadzemni delovi	3-4,5 g droge	
		<i>Silybum marianum</i> – badelj	plod	12-15 g	
Kožni sistem	Inflamatorna oboljenja kože	<i>Solanum dulcamara</i> – razvodnik	stabljika	površinski	Bedi i Shenefelt, 2002; Millikan, 2002; Capasso i sar., 2003
		<i>Linum usitatissimum</i> – lan	seme	1-2 g	
		<i>Hypericum perforatum</i> – kantarion	nadzemni delovi	površinski	
		<i>Juglans regia</i> – orah	list	površinski	
		<i>Matricaria recutita</i> – kamilica	cvast	3-10 % sirove droge ili infuza za tuširanje	
		<i>Oenothera biennis</i> – noćurak	seme (neisparljivo ulje)	8 % ulja	
		<i>Hamamelis virginiana</i> – hamamelis	list, kora	2 g lista ili kore kao infuz, ili 24 ml etanolnog ekstrakta	

* od navedene količine sirove droge najčešće se pripremaju čajevi, infuzi, dekolti ili tinkture koji se uzimaju 2-3 puta dnevno

Zbog svih navedenih bioloških aktivnosti, a u cilju zaštite i održanja ekološkog ekvilibrijuma, primena etarskih ulja i biljnih ekstrakata kao fitofarmaceutika i u prezervaciji hrane se sve više prihvata kao alternativa sintetskim hemijskim produktima. U periodu od 2000. do 2006. godine oko 50 % novih molekula je ekstrahovano iz prirodnih produkata, što ukazuje na njihov značaj u razvoju novih lekova za tretman infektivnih oboljenja (Newman i Cragg, 2007). U odnosu na konvencionalne antibiotike, prirodni antimikrobni agensi imaju brojne prednosti, kao što su manje štetnih efekata, široka prihvaćenost zbog njihove tradicionalne upotrebe, bolja biodegradacija, itd. (tabela 2.4).

Tabela 2.4. Konvencionalni vs. nekonvencionalni antimikrobni agensi

Konvencionalni antimikrobni agensi	Etarska ulja i biljni ekstrakti	Referenca
Baktericidni i bakteriostatski efekat	Baktericidni i bakteriostatski efekat	García-García i sar., 2011; Gradisar i sar., 2007; Kollanoor Johny i sar., 2010
Prirodni, polusintetski ili sintetski agensi	Prirodni agensi (nalaze se često u okruženju i tradicionalno se koriste)	Newman i Cragg, 2007; Langeveld i sar., 2014
Neselektivna aktivnost utiče na prirodni balans mikrobionata pacijenta	Neselektivna aktivnost	Trombetta i sar., 2005; Xu i sar., 2008;
Višestruki neželjeni efekti (alergije, sekundarne infekcije, itd.)	Ljudi su svakodnevno izloženi različitim bioaktivnim komponentama biljaka, bez poznatih ozbiljnih štetnih posledica po zdravlje	Rather i sar., 2012; Tisserand i Young, 2014; Council of Europe, 2008
Razvoj novih antibiotika je dug i naporan proces, do čijeg ostvarenja može proći i nekoliko godina	Ekstrakcija iz biljaka je relativno laka, ali hemijski satav varira u zavisnosti od velikog broja faktora	Pereira i sar., 2012; Al-Nuri i sar., 1996; Calabrese i sar., 2000; Newman i Cragg, 2007; Qian i sar., 2012
Bakterije koje su rezistentne na neki antibiotik pokazuju rezistenciju prema ostalim slične hemijske strukture sa kojima nisu dolazile u kontakt (ukrštena rezistencija)	Nivo bakterijske rezistencije je niži u poređenju sa antibioticima, jer prirodni agensi evoluiraju u okviru mehanizma odbrane biljke	Sutherland i sar., 1964; Rai i Kon, 2013; Yap i sar., 2014
Potrbna je ponovljena primena doza antibiotika radi potpunog izlječenja bakterijske infekcije	U nekim slučajevima neophodna je ponovljena primena u cilju izlječenja bakterijske infekcije	Burt i sar., 2004; Calabrese i sar., 2000; Chopra i Roberts, 2001;
Proizvodnja je komplikovana i skupa	Proizvodnja je jednostavna i jeftina	Yap i sar., 2014; Qian i sar., 2012
Nakon više od 20 godina 2015. godine je pronađena nova klasa antibiotika (teiksobaktin), ali aktivna samo protiv Gram pozitivnih bakterija	Novo bioaktivne komponente etarskih ulja i/ili biljnih ekstrakata efikasne protiv Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija su otkrivene i prečišćene poslednjih godina	Newman i Cragg, 2007; Qian i sar., 2012; Ling i sar., 2015; Boucher i sar., 2009

Iz navedenih razloga, istraživanja efikasnosti etarskih ulja, biljnih ekstrakata i bioaktivnih komponenti u borbi sa problemom multiple rezistencije bakterija, čak i kao agenasa za kontrolu biofilma, su veoma aktuelna (Clark, 1996; Cowan, 1999; Mimica-Dukić i sar., 2010; Akin i sar., 2010; Nuryastuti i sar., 2009). Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i biljnih ekstrakata različitih biljnih vrsta je veoma dobro ispitana, naročito u *in vitro* uslovima. Veliki

broji istraživanja je fokusiran na njihovu sposobnost modifikacije rezistencije, što obezbeđuje smernice i moguće pravce daljih ispitivanja, čiji je glavni cilj poništavanje rezistencije bakterija na antibiotike (Burt, 2004; Clark, 1996; Hemaiswarya i sar., 2008; Rosato i sar., 2010; Duarte i sar., 2013). Međutim, još uvek nema dovoljno podataka kada je u pitanju *A. baumannii*, koji predstavlja poseban terapijski izazov.

2.3.2. BILJKE KAO IZVOR ANTIMIKROBNIH AGENASA

U predstojećim poglavljima biće izložene osnovne karakteristike 37 biljaka iz 8 porodica (Myrtaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Polygonaceae, Urticaceae i Alliaceae), čiji su bioaktivni produkti ispitivani u ovom radu protiv genomske vrste *Acinetobacter baumannii*.

2.3.2.1. PORODICA Myrtaceae

Biljke ove porodice su drvenaste, žbunaste, zimzelene i proizvode etarska ulja. Porodica Myrtaceae obuhvata oko 130 rodova i 4500 vrsta rasprostranjenih u tropskim i subtropskim predelima. Opšta karakteristika predstavnika ove familije je prisustvo veće ili manje količine etarskih ulja u različitim biljnim organima, a najčešće u listu. Značajni rodovi ove porodice biljaka su *Myrtus* i *Eucalyptus*.

***Myrtus communis* L. subsp. *tarentina* (L.) Arcang. 1882** je zimzelena višegodišnja grmolika biljka visine od 1,8 do 2,4 m (Sumbul i sar., 2011). Životni vek joj je i do 300 godina. Raste na nadmorskoj visini do 800 m. Listovi su dugi 3-5 cm, usko-jajasti, naspramni i kožasti (slika 2.4). Cveti u julu i avgustu. Cvetovi su aktinomorfni sitni, bele boje i karakterističnog mirisa. Plod je bobica prečnika 5-7 mm najčešće plavo-crne boje (Rowshan i sar., 2012). Rasprostranjena je u Mediteranu, južnoj Evropi i Bliskom istoku. Mirta je česta biljka u mediteranskim zimzelenim šumama i makijama. Razvija se u predelima sa silikatnim supstratom i srednje vlažnoj i vlažnoj klimi. Poznata je po svojim raznovrsnim biološkim aktivnostima, kao što su antihiperглиkemijski, antiseptički i anti-inflamatorni efekti (Rowshan i sar., 2012). U narodnoj medicini koristi se za lečenje kožnih bolesti, respiratornih problema, urinarnih infekcija (Berka Zougali i sar., 2012). Različiti delovi biljke sadrže etarska ulja u različitoj količini. Rezultati istraživanja Wannes i sar. (2010) pokazuju da listovi mirte sadrže 0,61 % etarskog ulja, cvetovi 0,30 %, a stabljika 0,08 %. Analizom etarskog ulja ploda identifikovano je 47 različitih jedinjenja, pri čemu dominiraju jedinjenja iz klase monoterpena (1,8-cineol, geranil acetat, linalol i α -pinen) (Wannes i sar., 2010), dok su u etarskom ulju lista mirte najzastupljeniji 1,8-cineol, α -pinen, limonen, terpenil acetat, linalil acetat, bornil acetat (Rowshan i sar., 2012).



Slika 2.4. *Myrtus communis*
(<http://www.plantoftheweek.org/image/myrtus.jpg>)



Slika 2.5. *Eucalyptus camaldulensis*
(http://www.floradecanarias.com/imagenes/eucalyptus_camaldulensis2.jpg)

***Eucalyptus camaldulensis* D. 1832** je drvenasta biljka, takođe iz porodice Myrtaceae, koja dostiže visinu do 45 m. Listovi su kožasti na kratkim drškama, lancetasti, celog oboda, dužine 8-22 cm (slika 2.5). Cvetovi su u pazuhu listova, beli, grupisani u grozdove od 7-11. Cveta od decembra do februara. Plod je drvenasta čaura (McMahon i George., 2010). Listovi sadrže 0,1-0,4 % etarskog ulja, u kome je najzastupljenija komponenta eukaliptol (1,8-cineol) sa 63 % koji je zaslužan za raličite farmakološke aktivnosti ulja eukaliptusa (Ayepola i Adeniyi, 2008). Fitohemijske analize sirovog ekstrakta vrsta roda *Eucalyptus* potvrdila su prisustvo saponina, saponin glikozida, steroida, kardiotioničnih glikozida, tanina, isparljivih ulja, fenola i flavonida kao glavnih aktivnih komponenti. Utvrđeno je i da lišće ove biljke pored etarskih ulja (1 do 2 %), sadrži i betulinsku kiselinu, eukaliptičnu kiselinu, eukaliptoičnu kiselinu, oleanoičnu kiselinu i ursoličnu kiselinu (Falahati i sar., 2005). Etarska ulja eukaliptusa se u narodnoj medicini koriste za lečenja plućnih bolesti, gljivičnih infekcija, dok se isparljiva ulja koriste kao ekspektoransi (Ayepola i Adeniyi, 2008).

2.3.2.2. PORODICA Cupressaceae

Porodica Cupressaceae obuhvata 30 vrsta i 133 varijeteta, koje su skoro isključivo rasprostranjene na severnoj hemisferi, sa jednom vrstom koja se prostire na teritoriji Afričkog kontinenta. Iz ove familije analizirano je osam vrsta roda *Juniperus*. Postoji više infrageneričkih klasifikacija roda *Juniperus*. Međutim, jedna od novijih je klasifikacija Adams (2008), gde se rod *Juniperus* deli na tri podroda: *Caryocedrus* (1 vrsta), *Juniperus* (sadrži 10 vrsta) i *Sabina* (sadrži 56 vrsta).

Širom sveta biljke roda *Juniperus* se smatraju poznatim tradicionalnim lekovitim biljkama, zahvaljujući brojnim terapeutskim svojstvima kao što su anti-inflamatorno, diuretsko, antiseptičko, antihelmintsko, hipoglikemično, hipotenzivno i analgetsko. Medicinska primena podrazumeva korišćenje svih delova biljke zajedno sa etarskim uljem. Ove biljne vrste se intenzivno koriste i u narodnoj medicini za lečenje prehlada, urinarnih i bubrežnih infekcija, kao i dermatoloških oboljenja, zatim bronhitisa, pneumonije, dizenterije, krvarenja, reumatoidnog artritisa, bola u stomaku, dijareje, hemoroida, regulisanje menstruacije i ublažavanje menstrualnih bolova (Lesjak i sar., 2011).

***Juniperus sabina* L. 1753** je vrsta koja raste na većim nadmorskim visinama, a rasprostranjena je na planinama srednje i južne Evrope, Male Azije, Kavkaza, Urala i Sibira (Vidaković, 1982). Ova vrsta je u narodu poznata kao planinska somina. To je grm visine do 5 m, sa nepravilnom krošnjom koja je uglavnom polegla, sa dimorfnim iglicama neprijatnog mirisa, koje su kao mlade oštre, ljuspaste i unakrsno raspoređene (slika 2.6). Ovo je jednodoma ili dvodoma vrsta, a zrele ženske šišarke su okruglog oblika, tamno ljubičaste boje i prečnika 5-7 mm, a sazrevaju u drugoj godini. Igllice i šišarke su otrovne (Jovanović, 1982). *J. sabina* je medicinska biljka koja se koristi u narodnoj medicini kao abortiv, a lignani ove vrste poseduju antineoplastičnu i antiviralnu aktivnost, dok njena etarska ulja poseduju antibakterijsku i antiviralnu aktivnost (Alm, 2003; San Feliciano i sar., 1993).

***Juniperus sibirica* Burgsdorf. 1787** je nizak žbun sa gustim i kratkim granama poleglim po zemlji zbog čega je u narodu je poznata pod nazivom patuljasta kleka ili klečica (slika 2.7). Igllice su sabljasto savijene prilegle uz grančicu, sa naglo zašiljenim vrhom, dužine 0,1-1 cm. Lice iglica je udubljeno, beličaste boje, dok je naličje tamno zelene boje i sjajno. Zrele ženske šišarke su veličine 7-10 mm, jajaste ili okrugle, a sazrevaju u maju. Ovaj takson je rasprostranjen u alpskom i subalpskom pojasu planina Evrope, Azije i Severne Amerike, kao i u arktičkim predelima ovih kontinenata. U Republici Srbiji ova vrsta raste na Kopaoniku, Goliji, Mokroj planini, Suvoj planini, Staroj planini, Prokletijama (Jovanović, 1982). Ova vrsta predstavlja izvor antioksidativnih i anti-inflamatornih agenasa (Lesjak i sar., 2011).

***Juniperus oxycedrus* L. 1753** je najčešće veliki grm, može biti i manje razgranato drvo visine do 8 m, a u narodu poznat kao smrika ili smrič (slika 2.8). Ovo dvodomo drvo ima dugačke i debele grane sa krutim iglicama dužine 12-18 mm. Igllice su veoma oštrog vrha i sa gornje strane imaju dve bele pruge, a sa donje strane su zelene boje sa uzdužnim ispupčenjem. Šišarka sazreva u drugoj godini sa 1-4 semena. Zrela ženska šišarka je mesnata, prečnika 6-10 mm, crveno-smeđe ili crveno-žute boje. Ova vrsta je široko rasprostranjena po celom Mediteranu (Jovanović, 1982). Aromatična ulja dobijena iz *J. oxycedrus* su od davnina primenjivana zbog svojih korisnih svojstava, kao mirisni, arome, u medicini, kao antibakterijski agensi, insekticidi, i u kozmetičke svrhe. U Španiji se ova biljka koristi u narodnoj medicini za lečenje stomačnih tegoba, a često se koristi i kao začim, naručito u evropskoj kuhinji (Medini i sar., 2013).

***Juniperus communis* L. 1753** je žbun ili drvo visine do 12 m sa jajastom i kupastom krošnjom. Vrsta *J. communis* je u narodu poznata kao kleka, obična borovica, venja ili smreka (slika 2.9). Listovi su igličasti, raspoređeni po tri u pršljenu, povijeni, kruti, ušiljeni, dužine 7-16 mm. Na sredini lica iglica nalazi se bela traka stominih otvora, a bočno se nalaze dve zelene trake. Šišarke se razvijaju u periodu april-jun i bobičaste su. Zrele ženske šišarke su okruglastog oblika debljine 6-9 mm, a u fazi pozne zrelosti su ljubičaste boje. Ova vrsta kleke je široko rasprostranjena u celoj Evropi, Severnoj Aziji i Severnoj Americi. Na teritoriji Republike Srbije takođe je široko rasprostranjena, od Fruške gore i Deliblatske peščare pa do južnih krajeva zemlje (Jovanović, 1982). Šišarke ove vrste u narodu su najpoznatije kao dodatak u procesu proizvodnje rakije klekovače, a koristi se i u dekorativne svrhe (Adams, 2008). Plodovi ove vrste se koriste kao lek u mnogim kulturama uključujući Navaho narod, kao i druga plemena u zapadnoj Americi, koja su koristila ovu biljku u obliku čaja, a takođe i kao kontraceptivno sredstvo kod žena (McCabe i sar., 2005).



Slika 2.6. *Juniperus sabina*
(<http://www.conifers.org/cu/ju/sabina2.jpg>)



Salika 2.7. *Juniperus sibirica*
(http://www.pharmakobotanik.eu/systematik/7_bilder/liebermn/Lb-00602.jpg)



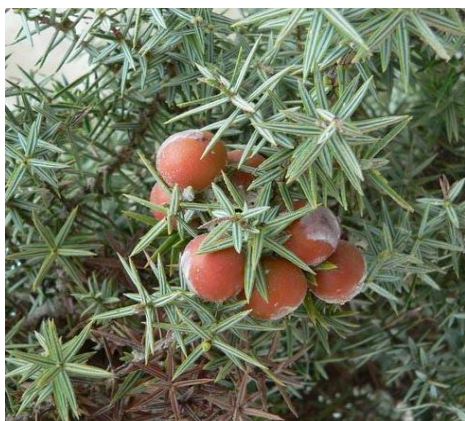
Slika 2.8. *Juniperus oxycedrus*
([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/21/Juniperus_oxycedrus_subsp._oxycedrus_\(frits\).jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/21/Juniperus_oxycedrus_subsp._oxycedrus_(frits).jpg))



Slika 2.9. *Juniperus communis*
(Fotografija: dr Ružica Igić)

***Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm. 1878** je grm ili malo drvo visine 5-6 m u narodu poznata kao pukinja ili ljuskavac (slika 2.10). Piramidalnog habitusa, koji se kasnije sve više

zaokružuje, sa grančicam usmerenim prema gore. Igličasti listovi dužine 2-3 cm, su dosta meki i sa gornje strane imaju dve bele pruge. Zrele ženske šišarke su krupne, okruglaste i veličine 1,2-1,5 cm, jestive su, crveno-smeđe ili tamnosivo-smeđe boje, bez sjaja, a sastoje se od 3, ređe od 6 ljuspi (epimacijuma) sa po tri semenke. *J. macrocarpa* je karakteristična mediteranska vrsta, rasprostranjena od Španije do Sirije, gde ulazi dublje u kontinent i nastanjuje termofilna submediteranska staništa. Raste na degradiranim zemljištima, a koristi se i u hortikulturi (Vidaković, 1982). Ova biljna vrsta se takođe koristi i u narodnoj medicini zbog visokog sadržaja etarskog ulja i mnoštva biološki aktivnih komponenti. Lišće se obično koristi kao začim, a kao narodni lek se koristi za lečenje hiperglikemije, gojaznosti, tuberkuloze, bronhitisa i pneumonije (Medini i sar., 2013).



Slika 2.10. *Juniperus macrocarpa*
(<http://www.biolib.cz/IMG/GAL/42719.jpg>)



Slika 2.11. *Juniperus excelsa*
(<http://www.botansad.com.ua/images/phocagallery/dendrologia/juniperus%20excelsa.jpg>)



Slika 2.12. *Juniperus phoenicea*
(http://www.florasilvestre.es/mediterranea/Cupressaceae/Juniperus_phoenicea.jpg)



Slika 2.13. *Juniperus foetidissima*
(https://c2.staticflickr.com/8/7084/6994881120_3b2567a124.jpg)

***Juniperus excelsa* M. Bieb. 1800** je visok žbun ili drvo do 20 m visine, a u narodu je ova vrsta poznata kao divlja ili gorska foja (slika 2.11). Krošnja je na početku čunjastopirimalna, a kasnije više okruglasta sa izrazito tankim mladim granama (jedva 1 mm debljine) i heteromornim listovima. Listovi su tupi i ljuspasti dužine 1-2 mm, prilegli su uz granu, naspramno postavljeni i poredani u 4 reda. Na starijim jedinkama se ponekad

pojavljuje igličasto lišće, dužine 5-6 mm, koje na gornjoj strani ima dve plavičaste pruge. Zrela ženska šišarka je okruglog oblika prečnika oko 0,9 cm, sazreva u drugoj godini života biljke, a u fazi punog zrenja ima zagasitu smeđe-ljubičastu boju i sadrži 3-6 semenki. Ova vrsta raste na Balkanskom poluostrvu i u Maloj Aziji do Kavkaza, na Krimu, Himalajima i Tibetu (Vidaković, 1982). Vrsta *J. excelasa*, kao i ostale vrste ovog roda, ima primenu u narodnoj medicini, na primer u provinciji Hormozgan na jugu Irana koristi se za lečenje bola u uhu (Soltanipour, 1999).

***Juniperus phoenicea* L. 1753** je grm ili manje drvo do 6 m visine sa gustom krošnjom, a u narodu je poznata pod nazivom primorska somina (slika 2.12). Mladi listovi su iglice, dok su starije iglice ljuspastog oblika i dužine 1 mm. Ljuspasto lišće je čvrsto prileglo uz granu i raspoređeno po tri u pršljenu. Ova vrsta je jednodoma ili dvodoma, a zrela ženska šišarka je okrugla, veličine oko 10 mm u prečniku, žuto-smeđe boje i sadži 3-9 semenki. *J. phoenicea* može da živi i do 1000 godina, a široko je rasprostranjena u Mediteranskom području, svuda oko Sredozemnog mora (Vidaković, 1982). Koristi se u narodnoj medicini kao diuretik i tonik za stimulaciju i jačanje stomaka. Dekokt pripremljen od lišća i/ili ploda se koristi za lečenje dijareje, reumatizma i dijabetesa (Bekhechi i sar., 2012).

***Juniperus foetidissima* Willd. 1806** u narodu je poznata pod nazivom pitoma foja (slika 2.13). Odlikuje je srednje visoko stablo do 15 m visine, vitka krošnja, piramidalnog oblika koja se spušta do zemlje, i sa uspravljenim granama. Iglice su dimorfne, ljuspaste ili igličaste, raspoređene naspramno u četiri reda. Igličasti juvenilni listovi mogu biti primaknuti uz grančicu ili su od nje odvojeni gornjim delom. Ljuspasti listovi su dugi 1,5 mm, jajastotrouglastog oblika i na vrhu zašiljeni. Kada se protrljaju, svi listovi imaju neprijatan miris. Zrele šišarke su okruglog oblika u prečniku 6-12 mm, tamno ljubičaste su boje, a sazrevaju u drugoj godini i sadrže 1-3 semenke. Vrsta *J. foetidissima* rasprostranjena je na planinama južnog Balkana, na Krimu i u maloj Aziji (Jovanović, 1982). Ekstrakti lista i ploda ovde vrste poseduju citotoksičan efekat i dobru antioksidativnu aktivnost, koja doprinosi i njihovoj antikancerogenoj aktivnosti (Sadeghi-aliabadi i sar., 2009).

2.3.2.3. PORODICA Lamiaceae

Lamiaceae su zeljaste ili drvenaste biljke (šibljice) vrlo retko drveće ili liane. To je vrlo opširna familija sa 200 rodova i 3200 vrsta rasprostranjenih po čitavoj Zemlji, ali najveće bogatstvo rodova i vrsta nalazi se u Mediteranu od prednje Azije (u hladne predele dopire mali broj vrsta). U flori Balkanskog poluostrva Lamiaceae su zastupljene sa 371 vrstom, što ovu porodicu biljaka stavlja na drugo mesto po broju vrsta u ovom delu Evrope. Od navedenog broja vrsta, 84 vrste porodice Lamiaceae su balkanski endemiti (Diklić, 1974).

***Hyssopus officinalis* L. 1753** poznata i kao miloduh, isop ili hisop (slika 2.14). To je višegodišnja žbunasta biljka sa mnogobrojnim granama dužine 5-15 cm, koje su polegle na

zemlji, a nekada mogu biti uzdignute. Ova vrsta ima zimzelen izdanak, pokriven kratkim običnim dlakama, blede zelene boje. Izdanak ima veliki broj utisnutih žlezda, zbog čega ga karakteriše oštar aromatičan miris. Listovi su skoro sedeći, lancetastog oblika dužine 1-3 cm, čvrsti, kožasti, goli, sjajni, a na licu i naličju gusto pokriveni uljanim žlezdama. Cvetovi su veličine 8-12 mm sa kartkim uspravnim cvetnim drškama, a nalaze se u pazuhu gornjih listova, složeni u dihajizijume, i zajedno sa listovima čine prividne klasove dužine 2-10 cm. Ljubičasto obojena čašica je cevasta, gusto pokrivena maljama, dužine 3-5 mm i poseduje 15 nerava. Krunica je većinom ljubičasta ili plavičasta, ređe ružičasta ili bela, sa gornjom i donjom usnom. Gornja usna krunice je vrlo kratka, skoro prava, jajastog oblika i na vrshu usečena, dok je donja usna najmanje duplo duža i troreznjevit. *H. officinalis* ima 4 prašnika i svi su jako izbačeni izvan krunice, a stubić je duži od prašnika. Plodići su jastočetvorouglastog oblika, dužine oko 2 mm, glatki i mrko obojeni (Diklić, 1974). *H. officinalis* naseljava sušna staništa, jako osunčane stene, siromašne pašnjake, a pre svega krečnjačku podlogu. Ova vrsta je rasprostranjena od Altaja do Urala, pored Kaspijskog jezera i Crnog mora, Bugarske, ilirskih zemalja, od Crne Gore do Karsta. U pitanju je pretežno mediteranska vrsta, jer naseljava Italiju, južnu Francusku i Španiju (Diklić, 1974). Koristi se u medicinske svrhe, za iskašljavanje, protiv raznih respiratornih oboljenja poput gripa, prehlade, bronhitisa, itd. Može se koristiti i za spoljnu primenu u lečenju opekotina i modrica. Takođe, utiče na nervni sistem i koristi se za ublažavanje anksioznosti, ali i kao digestivni stimulant. Većina lekovitih dejstava pripisuje se etarskom ulju ove vrste (Hoffmann, 2010).

***Mentha x piperita* L. 1753** je u narodu poznata kao metvica, nana i pitoma nana (slika 2.15). Ova vrsta je višegodišnja zeljasta biljka sa horizontalnim rizomom. Stabljike su visine 30 do 100 cm, pri osnovi su uzlažeće, a kasnije su uspravne i razgranate, često su crvenkaste boje. Na drškama dužine 6-8 mm nalaze se listovi, čije su liske jajasto izduženog ili lancetastog oblika. Liske su dugačke 3-8 cm, gole i tačkasto žlezdaste, tamno zelene boje, a po ivici su nazubljene krupnim, nejednakim i dugim zupcima. Cvetovi se nalaze na vrhovima stabljika i grana, sakupljeni u izduženo glavičaste klasolike, kratke i široke cvasti. Čašica je cevasta i gola, ljubičasto obojena, takođe tačkasto žlezdasta, sa uspravnim zupcima tri puta kraćim od čašične cevi, dok je krunica gola sa beličastom cevi i ružičastim ili plavkastoljubičastim režnjevima. Prašnici su kraći od krunice iz koje strči stubić. Plod je objajasta orašica dužine 0,75 mm, tamno-mrke boje, koja je na vrhu žlezdasta (Janković, 1974). *M. x piperita* je vrsta koja se gaji po baštama i u vrtovima, ponekad podivlja. Ova vrsta je široko rasprostranjena. Danas je kultivisana u većem delu Evrope (severno od južne Švedske), zatim u Kini, Japanu, indijsko-himalajskom području, Severnoj i Južnoj Americi. Na Balkanskom poluostrvu ova vrsta je rasprostranjena u kulturi, često subsponatno (Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Srbija i Bugarska) (Janković, 1974). *M. x piperita* poseduje velik privredni značaj. To je medonosna, lekovita, aromatična biljka poznata po etarskim uljima, *Folia menthae piperitae* i *Oleum menthae piperitae*, koja se u obliku mnogih sorti razmnožava

vegetativno. Etarsko ulje pitome nane sadrži mentol (38-65 %), citrol, geraniol, dihidrokarvon i karvon. Najviše ulja ima u cvastima, manje u listovima, a najmanje u stabljici. Listovi pitome nane koriste se kao čaj za stomačna oboljenja, a etarsko ulje se koristi kao sredstvo za spolju upotrebu u tretmanu različitih bolesti (npr. reumatizam i neuralgije), kao i za poboljšanje ukusa drugih lekova. Pitoma nana sadrži vitamin A, a biljka se koristi i u proizvodnji bombona, likera i napitaka. Značajna je njena primena i u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Janković, 1974).

***Satureja hortensis* L. 1753** ili čubar je jednogodišnja zeljasta biljka ili poluzbun (slika 2.16). Listovi su sa utisnutim žlezdama, linearnog do lancetastog oblika, nazubljeni su ili sasvim neznatno nazubljeni. Cvetovi su dugački 5-15 mm, bele, plave, ljubičaste ili ružičaste boje sa kratkom cetnom drškom. Čašica je zvonastog oblika sa 10 nerava i 5 jednakih zubaca koji su šiljati na vrhu. Krunica je dvousnata sa pravom kruničnom cevi, koja je po dužini jednaka sa čašicom ili je malo duža. Gornja usna krunice je prava, cela ili na vrhu usečena, dok je donja troreznjevita sa zaokrugljenim režnjevima. Četiri prašnika se nalaze ispod gornje krunične usne, pri čemu su dva prašnika malo duža od krunice, a prašnice su paralelne ili pod uglom. Na vrhu stubića nalaze se dva jednaka režnja žiga. Plodići su glatki, jajasti ili skoro okruglasti (Diklić, 1974). Vrsta je rasprostranjena u toplim oblastima obe hemisfere, a naročito mediteranskim predelima. Ova aromatična i lekovita biljka je nativna u južnoj Evropi, a naturalizovana je u Severnoj Americi. Ova vrsta se koristi u ishrani kao aroma, u biljnim čajevima, i u tradicionalnoj medicini za lečenje bolesti kao što su mučnina, grčevi, otežano varenje, bol u mišićima, dijareja i razne infekcije (Gulluce i sar., 2003).

***Thymus serpyllum* L. 1753** ili majčina dušica je višegodišnja zeljasta biljka ili žbun (slika 2.17). Posедуje dugačku stabljiku koja je pri osnovi odrvenela, puzi u vidu izduženih stolona i razvija adventivne korenove, a na vrhu se završava sterilnom rozetom listova. Cvetne grane su visine 4-7 cm, a razvijaju se duž položenog stabla u nizovima i ravnomerno su pokrivene dlakama sa svih strana. Listovi su mali, čvrsti i krupni, uzano jajasto-eliptičnog oblika i dužine 4-6 mm. Cvetovi su smešteni na vrhu grana, složeni u okruglaste, ređe izdužene cvasti. Čašica je dužine 3,5-4 mm i pokrivena dlakama, a čašični zupci su pokriveni dugačkim trepljama (Diklić, 1974). Ova vrsta nastanjuje pretežno peskovita mesta, a kao evropska kontinentalna vrsta rasprostanjena je u severnoj i centralnoj Evropi. U Srbiji je rasprostranjena u Vojvodini, tačnije na Fruškoj gori (Diklić, 1974). Koristi se kao antiseptik, anthelmintik, karminativ, ekspektorans, sedativ, tonik, konzervans, aromatik, stomahik i antispazmotik. Majčina dušica ima raznovrsnu primenu u medicini, farmaciji, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, zatim u industriji alkoholnih i bezalkoholnih napitaka i industriji boja i lakova (Tucakov, 1984).



Slika 2.14. *Hyssopus officinalis*
(http://www.plantsystematics.org/users/jdelaet/1_10_08_8/oepl0a741/nDSC_6663.JPG)



Slika 2.15. *Mentha x piperita*
(http://luirig.altervista.org/cpm/albums/bot-units01/mentha-piperita-f_-rubescens8222.jpg)



Slika 2.16. *Satureja hortensis*
(<http://luirig.altervista.org/cpm/albums/bot-units34/satureja-hortensis30648.jpg>)



Slika 2.17. *Thymus serpyllum*
(http://upload.wikimedia.org/Thymus_serpyllum_kz1.jpg)



Slika 2.18. *Thymus vulgaris*
(http://cdn2.bigcommerce.com/server3300/c93be/product_images/uploaded_images/thyme-live.jpeg)

Thymus vulgaris L. 1753 je biljka u narodu poznata kao timijan ili timus (slika 2.18). To je polužbun, visine 20-30 cm sa odrvenelim prošlogodišnjim granama. Cvetne grane su ravnomerno sa svih strana pokrivene kratkim, naniže okrenutim maljama. Donji listovi na cvetnim granama su unazad uvijeni, zbog čega izgledaju kao da su linearni. Srdnji, gornji i pricvetni listovi su sa kratkom cvetnom drškom, na licu goli, a na naličju gusto pokriveni sivim ili belim dlakama, pri osnovi, duž oboda liske, nisu pokriveni trepljama. Cvasti su izdužene, a čašica dužine 3-5 mm je sa trbušne strane pokrivena kratkim čekinjastim dlakama. Na gornjoj usni čašice zupci su kratko-trouglastog oblika i neznatno pokriveni trepljama. Krunica je spolja pokrivena kratkim čekinjastim dlakama. Listovi, čašica i krunica su gusto pokriveni svetlucavim žlezdama (Diklić, 1974). Ova biljna vrsta je mediteranskog porekla i kultivisana je u Evropi, a koristi se u ishrani kao začim (Diklić, 1974). Oralno se koristi za lečenje suvog i velikog kašlja, bronhitisa, astme, laringitisa, loše probave, gastritisa

i dijareje. Spolja se koristi za lečenje krajnika, bolesti desni, reumatizma, artritisa i gljivičnih infekcija. Etarsko ulje ove vrste poseduje izraženu antiseptičku aktivnost, a sadrži 20-54 % timola (Bown, 1995).

Origanum vulgare L. subsp. vulgare L.1753 je višegodišnja zeljasta biljka poznata pod nazivom vranilova trava (slika 2.19). Horizontalni rizom je sa podzemnim stolonima i mnogobrojnim končastim korenima. Izdranak je uglavnom prilično snažan, može biti skoro go ili gusto pokriven dugačkim dlakama, sa sedećim žlezdama, aromatičan je i obojen tamno-zeleno, a često može biti i purpurno-ljubičaste do mrkocrvenkaste boje. Stabljika samo pri osnovi delimično leži na zemlji, ostalim delom je uspravna, kruta, visine 20-50 cm. Listovi su sa lisnom drškom dužine 3-10 mm, liska je jajastog oblika dužine 1-4 cm, nenazubljena ili nejasno nazubljena, a pri osnovi je naglo sužena u dršku. Liska na licu i naličju ima utisnute žlezde. Cvetovi su dugački 4-7 mm sa kratkom cvetnom drškom, po 1-3 složeni u sedeće dihazijume, koje su grupisane u male, terminalne i pazušne, galvičaste cilindrične ili prizmatične, jajaste prividne klasiće, koji zajednički stvaraju razređene, piramidalne do štitaste cvasti u vidu metlice. Čašica je zvonasta, a čašična cev je levkasta sa 13 slabo istaknutih nerava. Krunica je dvousnata, cevasta, svetlo do tamno crvene boje, a ponekad može biti i prljavo bele boje. Krunična cev kod dvopolnih cvetova je uočljivo duža od čašice, dok su prašnici okruglasti i daleko izlaze van krunice. Polenova zrna imaju 6 uzdužnih nabora. Stubić dužinom nadmašuje prašnike. Plodići su izduženog jajastog oblika, dužine oko 1mm, glatki i mrke boje (Diklić, 1974).

Ova biljka nastanjuje sušne obronke, siromašne livade, a takođe se može naći u svetlijim listopadnim šumama, šikarama i na šumskim progalama do 2000 m nadmorske visine, a rasprostranjena je u Evropi i Aziji, zbog čega je okarakterisana kao Evroazijska vrsta mediteranskog značaja (Diklić, 1974). Koristi se u narodu kao čaj i lek za jačanje, takođe za lečenje bolesti organa za disanje i varenje (naročito za lečenje dijareje), a spolja se upotrebljava za lečenje raznih zapaljenja kože i sluznica.

Origanum vulgare L. subsp. hirtum (Link.) Ietsw. 1980 ili grčki origano je drvenasta, višegodišnja biljka sa rizomom (slika 2.20). Grane su veličine 90 cm, obično se granaju na gore, a pokrivene su mekim dlakama, krutim i čvrstim dlakama ili baršunastim dlakama, dok su retko gole, bez dlaka. Listovi su veličine 1-5 cm, ovalnog su oblika, mogu biti glatki ili dlakavi, celog oboda ili sa plitko zaobljenim testerasto nazubljenim obodom, i sa izraženim žlezdama. Cvetovi se nalaze na cvetnim drškama veličine 0,5-3 cm ovalnog, duguljastog ili prizmatičnog su oblika i formiraju gronju ili metlicu. Krunični listići su veličine 4-5 mm, skoro dva puta duže od čašice, ovalnog su oblika, ne završavaju se naglo, mogu biti gole ili prekrivene dlakama, poseduju žlezde i obojene su purpurno-ljubičasto ili beličasto-zelenkasto. Čašica poseduje žlezde i može biti glatka ili prekrivena dlakama. Krunica je veličine 4-7 mm, bele ili ređe purpurno-crvene boje (http://www.cretanflora.com/origanum_vulgare.html).



Slika 2.19. *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*
Fotografija: dr Ružica Igić



Slika 2.20. *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*
(<http://www.cretanflora.com/images/Origanum%20vulgare%20ssp.%20hirtum.jpg>)



Slika 2.21. *Origanum majorana*
(<http://www.iherbalstore.com/wp-content/uploads/2014/02/Origanum-Majorana11.jpg>)



Slika 2.22. *Salvia officinalis*
(<http://fitoapteka.org/images/foto/800/17.jpg>)



Slika 2.23. *Melissa officinalis*
(http://www.agrovizija.rs/cutenews/data/upimages/lekovito_maticnjak2.jpg)



Slika 2.24. *Lavandula angustifolia*
(<http://www.wildgingerfarm.com/images/LadyLavender01.JPG>)

Ova vrsta se može naći na grubo travnatim i kamenitim staništima, suvim sunčanim mestima, živim ogradama i pored puteva, a široko je rasprostranjena u Mediteranu, naročito na ostrvu Krit. Koristi se kao začinska biljka u kulinarstvu i u narodnoj medicini za lečenje prehlada, kašlja i gastro-intestinalnih problema (http://www.cretanflora.com/origanum_vulgare.html).

***Origanum majorana* L. 1753** ili majoram je jednogodišnja, dvogodišnja ili višegodišnja biljka, uspravna, visine 20-60 cm sa glatkim ili paperjasto dlakavim, razgranatim stablom (slika 2.21). Listovi su dužine 0,5-2 mm, ovalni do elipsasto-ovalni, tupi, zaokrugljeni i suženi pri bazi, celog su oboda, sive ili bele boje, ređe zeleni. Nervi su donekle izdignuti, niži listovi sa peteljkom dužine do 15 mm, dok su ostali listovi polusedeći. Cetovi su loptasti, ovalni ili duguljasti, gusto grupisani na kraju kratkih grana formirajući uske terminalne metlice. Čašični listići veličine 3-4 mm su zaobljeni sa tačkastim žlezdama. Čašica je veličine 2-5 mm, oivičena dubokim prorezom na jednoj strani, trepljasta. Krunica veličine 4 mm je bele, bledo-lila ili roze boje. Plodići veličine 0,75-1 mm su svetlo braon boje. Ova vrsta je kultivisana biljka, gaki se u sakijama, a lokalno je naturalizovana u južnoj Evropi, severnoj Africi i jugo-zapadnoj Aziji (Tutin i sar., 1972), najčešće se koristi kao začinska biljka i u narodnoj medicini.

***Salvia officinalis* L. 1753** je polužbun poznat pod nazivom žalfija ili kadulja (slika 2.22). Stablo je razgranato, grane su poglele po zemlji ili se izdižu. Izdanak je mat-zelene boje i gusto je pokriven belim, paučinastim dlakama, miriše na balzam. Stabljika visine 20-70 cm je snažna, uspravna ili se izdiže, u donjem delu je ljubičaste boje, većinom je prilično gusto pokrivena belim vunastim dlakama, a iz pazuha listova obično polaze kratki sterilni bočni izdanci. Listovi su bar delimično zimzeleni, čvrsti sa lisnom drškom dužine 1-5 cm. Liska dužine 2-9 cm je izduženo-jajastog do lancetastog oblika, na oba kraja zaokrugljena ili kratko šiljata, nazubljena je ili duž celog oboda vrlo fino tupo nazubljena, u početku je gusto pokrivena sivim maljama, a kasnije naročito na licu gola, fino naborana. Po 6-10 cvetova je složeno u 6-8 pršljenova postavljenih jedan iznad drugog, koji su međusobno razmaknuti najmanje za dužinu cveta. Cvetovi su dugački 2-3 cm sa cvetnim drškom dužine 3-6 mm. Čašica je cevasto-zvonastog oblika, zeleno ili ljubičasto obojena, dugačka 9-14 mm, koja je skoro do sredine podeljena na dve podjednako dugačke usne sa čašičnom cevi dužine 8 mm. Krunica je svetlo-ljubičaste boje, ređe bela, i oko 2,5 puta je duža od čašice. Gornja usna krunice dužine 1 cm je skoro prava, podeljena u dva kratka zaobljena režnja, a donja usna dužine 1,5 cm je trorežnjevita sa okruglasto-objajastim srednjim režnjem, koji je na vrhu usečen. Prašnički konci su jaki sa kratkim, veoma iskrivljenim konektivom, a stubić je malo duži od krunice. Plodići veličine 2-3 mm su skoro loptastog oblika, glatki i tamno-mrko obojeni (Diklić, 1974). Ova vrsta nastanjuje sušne, krečnjačke i kamenite površine, a rasprostranjena je u mediteranskom delu južne Evrope, od Španije do severnih Balkanskih zemalja, zatim u Maloj Aziji i severnoj Siriji. Žalfija je mediteranska vrsta, kultivisana u

cejoj Evropi i Severnoj Americi, a okarakterisana je kao biljka od privrednog značaja. Često se koristi u medicini u obliku čaja i tinkture (Diklić, 1974).

***Melissa officinalis* L. 1753**, matočina ili matičnjak je višegodišnja biljka sa kratkim rizomom (slika 2.23). Izdanak ima intenzivan miris na limun. Stabljika visine 30-80 cm je četvorouglasta, uspravna ili se izdiže, a sa većine čvorova polaze dugačke grane, koje se ponovo granaju. Osim toga, stabljika je pokrivena kratkim maljama i dugačkim dlakama, a u gornjem delu ima brojne žlezde. Listovi imaju dršku dužine 1,5-3,5 cm, lisku dugu 2-6 cm jastog do skoro rombičnog oblika, koja je na vrhu većinom kratko zašiljena do tupa, a pri osnovi plitko srcasto usečena ili klinasto sužena. Liska je samo na licu pokrivena proređenim dlakama ili je skoro potpuno gola, a na naličju ima sedeće žleze. Cvetovi veličine 1-1,5 cm imaju dršku dugačku 3-6 mm i u pazuhu listova su po 6-10 cvetova složeni u skraćene dihajizijume. Dvousnata čašica dužine 7-8 mm je cevasto-zvonastog oblika sa 10 jako istaknutih nerava, a pokrivena je mekim proređenim dlakama kao i žlezdama na drškama. Čašična cev je pri osnovi neznatno trbušasto proširena i iskrivljena, a sa leđne strane je malo spljoštena. Gornja usna je naviše savijena, široka i odsečena sa 3 vrlo mala zupca, dok je donja usna duža sa dva lancetasta zupca. Krunica je dvousna, plavičasto-bele, bleđo-ljubičaste ili žućkasto-bele boje i duplo je duža od čašice. Antere 4 prašnika leže spod gornje usne krunice. Plodići su izduženo-jajastog oblika, dužine 1,5-2 mm i kestenjasto-mrke boje (Diklić, 1974). Ova biljka raste na međama, zidinama, u vinogorju, oko sela i služi pčelinjoj ispaši, ali i kao začinska i lekovita biljka. Rasprostanjena je u istočnom delu sredozemne oblasti, od Italije do Kavkaza, ima je u Siriji, Iranu, Turkestanu i jugozapadnom Sibiru. Matičnjak je adventivna, mediteranska biljka, a u Srbiji je rasprostranjena sporadično (Diklić, 1974). Koristi se u kulinarstvu, ali i u tradicionalnoj i alternativnoj medicini za tretman poremećaja gastro-intestinalnog trakta, nervnog sistema, jetre i žuči, kao i u aromaterapiji.

***Lavandula angustifolia* Mill. 1768** ili lavanda (lavandula, despik) je višegodišnja biljka (slika 2.24). Ima stabljiku visine 20-60 cm, pepeljasto-sive boje, koja je još od osnove jako razgranata sa tankim granama i brojnim sterilnim izdancima. Listovi dužine 3-5 cm su celi, linearnog oblika i na vrhu šiljati, a duž oboda su uvijeni. Donji listovi su sive boje, a na licu i naličju gusto prekriveni razgranatim, zvezdastim dlakama, dok su gornji listovi sivo-zelene boje i proređenije pokriveni dlakama, a kasnije ogole. Po 4-6 cvetova je složeno u skoro sedeće dihajizije, koje grade 3-4 pazušna, međusobno udaljena prividna pršljena, koji se nalaze na drškama dužine 15-20 cm grupisani u klasoliku cvast. Čašica dužine 4-5 mm je cevastog oblika, pokrivena dlakama i žlezdama, ljubičasto-sive je boje sa 13-15 paralelnih nerava i 5 malih zubaca od kojih je jedan najrazvijeniji i on kao poklopac pokriva krunicu dok je još u pupoljku. Krunica je cevasta, dvousnata i duža od čašice, plavo-ljubičasto je obojena, pokrivena dlakama i žlezdama. Krunična cev je skoro prava, pri čemu je gornja usna krunice dvorežnjevita, a donja deljena u tri tupa režnja. Ispod gornje usne krunice uzdiže se 4 prašnika. Plodići dužine 2 mm su jajastog oblika, glatki i sjajni (Diklić, 1974). Ova vrsta

nastanjuje kamenjare, a rasprostranjena je u mediteranskoj oblasti. U Evropi je kultivisana kao industrijska, mirisna i dekorativna biljka, dok je u Srbiji mestimično gajena (Diklić, 1974). Lavanda se često koristi u domaćinstvima zbog svoje prepoznatljive arome, ova biljka deluje opuštajuće i umirujuće na nervni sistem. Etarsko ulje lavande se koristi kao snažan antiseptik, za ublažavanje neprijatnog zadaha, protiv grčeva, nadimanja, kao diuretik, sedativ, stimulans, itd.

***Ocimum basilicum* L. 1753** ili bosiljak je jednogodišnja biljka sa uspravnom stabljikom visine 20-45 cm (slika 2.25). Stabljika je uglavnom busenasto razgranata, najčešće potpuno gola, retko je gušće pokrivena dlakama i prijatnog je mirisa na balzam. Listovi dužine 3-5 cm su jajastog do skoro rombičnog oblika sa lisnom drškom dužine 1-2 cm, na vrhu su šiljati, celog su oboda, grubo nazubljeni do proređeno-testerasto nazubljeni, kod mnogih vrtnih formi isečeni i goli, sa 3-7 pari lučno savijenih bočnih nerava. Cvetovi dužine 1-1,5 cm imaju kratku cvetnu dršku i uglavnom su po 6 složeni pazušno u prividne pršljenove, koji su postavljeni jedan iznad drugog. Čašica je jajastog oblika, dvousnata je i zelena, sa jako istaknutim, mrežasto povezanim nervima. Čašična cev je vrslo kratka, gusto je pokrivena dlakama, a nakon precvetavanja je oborena. Krunica je crvenkaste ili žućkasto-bele boje, a gornja usna je široka i tupa, deljena u 4 režnja, dok je donja nešto duža, kašikasto, neznatno ispupčena i pravo ispružena. Prašnici leže na donjoj usni, a prašnice su loptastog oblika i žute boje. Plodići su jajastog oblika, dužine 1,5-2 mm i tamno-mrko do crno obojeni (Janković, 1974). Bosiljak autohtono raste verovatno samo u prednjoj Indiji, kao i u celoj južnoj Aziji i severoistočnoj Africi, i u tropskom delu Amerike, dok je kultivisana forma prisutna u umerenoj zoni obe hemisfere (Janković, 1974). Poznata je kulinarska biljaka, naročito listovi ove aromatične biljke, koji se koriste kao začim, a takođe se tradicionalno korsiti u narodnoj medicini u Indiji i jugoistočnoj Aziji. Tradicionalano se koristi kao medicinska biljka za tretman glavobolje, kašlja, dijareje, konstipacije, bradavica, i bubrežnih oboljenja (Simon i sar., 1999).



Slika 2.25. *Ocimum basilicum*
(http://pharmacy63.cade.uic.edu/pharmacy/garden/plantPhotos/45_2.jpg)



Slika 2.26. *Rosmarinus officinalis*
(http://calphotos.berkeley.edu/imgs/512x768/0000_000/0309/0034.jpeg)

***Rosmarinus officinalis* L. 1753** je zimzeleni, veoma aromatični žbun, a poznata je pod nazivom ruzmarin (slika 2.26). Stablo ove biljne vrste je jako razgranato sa uspravnim ili izdignutim granama i sivom korom. Mlade grane su tupo četvorouglaste i pokrivene maljama u pazuhu listova se razvijaju kratki bočni izdanci sa cvetovima. Listovi su linearni, kožasti i zimzeleni sa vrlo kratkom lisnom drškom. Dužina listova je 1,5-3,5 cm, nazubljeni su sa uzdužno uvijenim obodom, a na vrhu su kratko šiljati. Lice listova je glatko, bledo do tamno zelene boje i pokriveno je pojedinačnim, vrlo sitnim zvezdastim dlakama, dok je naličje sivo filcano, gusto pokriveno malim zvezdastim dlakama. Po 5-10 cvetova je složeno na vrhu kratkih bočnih izdanaka smeštenih u pazuhu listova u kratke prividne grozdove. Cvetovi su dugački oko 1 cm, sedeći ili sa kratkom cvetnom drškom dužine 2-4 mm. Čašica je dvousnata, zvonasta sa 8-12 nerava, mrko-zelene boje i sivo filcana sa konkavnom gornjom usnom i dvorežnjevitom donjom usnom. Krunica je takođe dvousnata, plavo-ljubičaste, ređe bele boje, koja je spolja pokrivena proređenim maljama. Krunična cev je kratka, nešto duža od čašice. Gornja usna je neznatno unazad povijena, a na vrhu duboko urezana, dok je donja trorežnjevita i nešto duža, takođe poseduje dva prašnika koji su mnogo duži od gornje usne krunice. Plodnik je duboko četvoro-režnjevit, a stubić je visoko postavljen i dugačak. Plodići su obrnuto-jajasti, dužine 1,5-2 mm i glatki (Diklić, 1974). Stanište ove biljke su makije sredozemene oblasti, a odavno je kultivisana u ostalim deovima Evrope. Ruzmarin je rasprostranjen u južnoj Evropi, od južne Francuske do Grčke, kao i na zapadnoj obali Male Azije i severnoj Africi. Na Balkanu raste u Hrvatskoj (u Primorju, Dalmaciji) i Makedoniji, a u Srbiji se gaji u vrtovima (Diklić, 1974). Sveže i osušeno lišće ruzmarina se često koristi u tradicionalnoj mediteranskoj kuhinji kao začim. Ruzmarin se koristi kao stimulans i blagi analgetik za lečenje glavobolje i slabe cirkulacije, a koristi se i kao sredstvo za dezinfekciju, ispiranje usta, kao i za lečenje groznice i reumatizma. Takođe, koristiti se i u kozmetičkoj industriji, najčešće u losionima za kosu (Calabrese i sar., 2000).

2.3.2.4. PORODICA Apiaceae

Porodica Apiaceae obuhvata 300 rodova i 3000 vrsta, rasprostranjenih u umerenoj zoni, i preovlađuju uglavnom zeljaste biljke, biološki vrlo raznolikog tipa, retko drvenasti oblici ili liane. U flori Balkanskog poluostrva ova familija je predstavljena sa 82 roda i 334 vrste, od čega su 49 isključivo endemitne vrste Balkana (Nikolić, 1973).

***Foeniculum vulgare* Mill. 1768** je poznat pod nazivima anason, komorač, morač i divlja mirođija (slika 2.27). To je višegodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka, sa beličastim podzemnim stablom vretenstog oblika, a neki divlji oblici pri osnovi odrvene. Stabljika je uspravna, visine 0,9-2 m, okruglog oblika, sitno izbrazdana, šuplja često od osnove razgranata. Listovi su 3-4 puta perasto deljeni, goli, sivo-plave boje, kao i cela biljka, prizemni su na drškama, ostali sa rukavcem i sedeći. Režnjevi poslednjeg reda su linearni ili

uzano linearni. Rukavci dužine 3-6 cm su prošireni i obuhvataju stabljiku. Štitovi su prilično krupni sa 4-25 zrakova različite dužine. Cvetovi su prilično mali i tamno-žute boje, a stubići u cvetu su vrlo kratki. Plod je jajasto izdužen, dužine 4-10,5 mm, na poprečnom preseku je osmougaoni sa jasno izraženim rebrima. Plodići na poprečnom preseku su tupo petougaoni. Brazde su sa pojedinačnim kanalima sa etarskim uljem, tako da se po dva kanala nalaze sa ventralne strane (Nikolić, 1973). Ova biljka naseljava žitna polja, kulture i zapuštene površine, a rasprostranjena je u sredozemlju i jugozapadnoj Aziji, dok se u kulturama nalazi u čitavom svetu. Široko je rasprostranjena i u Srbiji. Zbog svog privrednog značaja, gaji se kao povrće, začim, lekovita i ukrasna biljka, a upotrebljava se u narodnoj i veterinarskoj medicini (Nikolić, 1973). Utvrđeno je da poseduje antioksidativna, anti-inflamatorna, antimikrobna, bronhodilatatorna, diuretska, hipotenzivna, gastroprotektivna, hepatoprotektivna i druga svojstva, kao i da poboljšava pamćenje (Rahimi i Ardekani, 2013).

***Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A.W. Hill 1879** ili peršun je dvogodišnja gola biljka sa tanjim ili debljim vretenastim ili repastim korenom (slika 2.28). Cela biljka je prijatnog mirisa. Stabljika se javlja u drugoj godini, uspravna je, okrugla i visine 30-100 cm, a od sredine sa naspramno ili pršljenasto raspoređenim granama. Listovi su zeleni, sjajni, prizemni i donji na drškama, dva ili tri puta perasto deljeni, pri čemu su vršni režnjevi obrnutojajsto-klinasti, perasto usečeni ili trodelni sa jajasto-lancetastim isečcima, koji su kratko zašiljeni ili bodljasti. Gornji listovi su sedeći sa rukavcem u obliku opne, a vršni režnjevi su linearno-lancetasti ili linearni i po obodu celi. Štitovi se nalaze na dugačkim drškama, srednje su veličine sa 7-20 zrakova podjednake dužine. Štitići su sa većim brojem hermafroditnih ili muških cvetova. Krunični listići su beli ili žućkasto-zeleni. Plod dužine 2,5-3 mm je prošireno jajast, pri osnovi srcast sa tankim rebrima (Nikolić, 1973). Divlja forma ove vrste nastanjuje stare zidine i polja, ali se peršun najčešće gaji u vrtovima kao biljka za začim. Peršun je rasprostranjen u mediteranskoj oblasti, mediteranski je florni element. Gaji se u celoj Evropi i na ostalim kontinentima. Ova biljka je od privrednog značaja jer se koristi kao začim u ishrani, i u narodnoj medicini, kao lekovita biljka (Nikolić, 1973). Koristi se u lečenju dijabetesa, jer redukuje glukozu u krvi (Tunali i sar., 1999), a Nemačka komisija E je odobrila peršun za lečenje infekcija urinarnog trakta, bubrega i kamenja u bešici (Blumenthal i sar., 1998).

***Coriandrum sativum* L. 1753** je u narodu poznat kao korijander ili paprić (slika 2.29). To je jednogodišnja biljka sa tankim, vretenastim korenom. Stabljika visine 20-50 cm je uspravna, gola, okrugla i prugasta, a u gornjem delu je razgranata. Donji listovi su perasto deljeni ili dvostruko perasto deljeni sa klinastim vršno usečenim režnjevima, dok su gornji listovi 2-3 puta perasto deljeni, pri čemu su režnjevi poslednjeg reda linearni ili gotovo končasti. Štitovi se nalaze na dugačkim drškama sa 3-7 zrakova skoro jednake dužine. Krunični listići su beli ili crvenkasti, pri čemu su spoljašnji veći, dužine 3-4 mm.



Slika 2.27. *Foeniculum vulgare*

(http://online-media.uni-marburg.de/biologie/nutzpflanzen/bilder/vb/37a03_foeniculum_vulgare.jpg)



Slika 2.29. *Coriandrum sativum*

(http://lh4.ggpht.com/_rWksMjEBTQk/Sa1LhKKy1aI/AAAAAAAAAJ-M/aUjLZ-laKqc/s800/leo-mic-Coriandrum-sativum-390.jpg)



Slika 2.28. *Petroselinum crispum*

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/Petroselinum.jpg>)

Plod je loptast, širine 2-5 mm, mrke ili žućkaste boje. Stubići su izduženi sa glavičastim žigovima (Nikolić, 1973). Korijander raste na poljima, može se naći među kulturnim biljkama, a i gaji se u mnogim zemljama. Rasprostranjen je u istočnom delu Sredozemlja, dok se u kulturama gaji na svim kontinentima. Ova vrsta je takođe od privrenog značaja, jer se koristi kao začin, kao i u narodnoj medicini i farmaceutskoj industriji (Nikolić, 1973). Korijander se nalazi među najčešće korišćenim začinima, jer poseduje hranljiva kao i medicinska svojstva, jer seme ove vrste sadrži linalol kao dominantnu komponentu. Ova biljna vrsta se koristi u domaćinstvima za pripremu narodnih lekova za lečenje prehlade, groznice, mučnine, povraćanja, stomaknih tegoba, a takođe se koristi i za lečenje reumatizma i bola u zglobovima (Rajeshwari i Andallu, 2011).

2.3.2.5. PORODICA Asteraceae

Biljke porodice Asteraceae su pretežno zeljaste jednogodišnje i višegodišnje, ređe drveće i šiblje. To je ogromna kosmopolitska familija od 920 rodova i 19000 vrsta. U flori Balkanskog poluostrva nalazi se 913 autohtonih vrsta. Familija Asteraceae se deli na dve podfamilije: Asteroideae i Cichorioideae (Gajić, 1975).

Artemisia dracuncululus L. 1753 ili estragon, ruski estragon je zeljasta ili polužbunasta aromatična biljka (slika 2.30). Listovi su naizmenično raspoređeni, jednostavno ili više puta

perasto deljeni, retko celi. Glavice su male do velike, cilindrične ili loptaste, a nalaze se u grozdastim ili metličastim cvastima i često su viseće. Cvetna loža može biti gola, glatka ili sa dlakama. Svi cvetovi su dvopolni i cevasti. Krunica je končasto cevasta sa 2-3 zupca. Plod je cilindrična ili spljoštena ahenija bez jakih rebara (Gajić, 1975). Ova vrsta se može naći u stepskim oblastima Evrope i Azije, kao i srednje i severne Amerike. Listovi ove biljke su popularni u kulinarstvu, zbog blage arome. U tradicionalnoj narodnoj medicini estragon se koristi za lečenje problema sa varenjem i protiv crevnih parazita, ali i za spoljnu upotrebu za lečenje bolova u zglobovima. Komercijalno se koristi u kozmetičkoj industriji i kao aroma (Gajić, 1975).



Slika 2.30. *Artemisia dracunculus*

(http://www.awl.ch/heilpflanzen/artemisia_dracunculus/estragon_2.jpg)



Slika 2.31. *Achillea millefolium*

(http://www.titelskibreg.com/UserFiles/Image/titelskibreg/220px-Achillea_millefolium_vallee-de-grace-amiens_80_22062007_1.jpg)

***Achillea millefolium* L. 1753** ili hajdučka trava je u narodu još poznata i pod nazivima ajdučica, ajdučka trava i sporiš (slika 2.31). To je višegodišnja biljka visine 20-80 cm sa puzećim rizomom. Stabljika je uspravna sa dosta listova, najčešće je jednostavna i vunasto pokrivena dlakama. Mladi listovi su malo vunasto pokriveni dlakama, bez ili jedva sa žlezdastim tačkama koje su utisnute, osim toga listovi su dvostruko do trostruko perasto deljeni, pri čemu su reznjevi poslednjeg reda linearno lancetasti i šiljati. Glavice veličine 3-5 mm u prečniku se nalaze u gustim, ravnim i granatim gronjastim cvastima. Središnji cvetovi su prljavo-beli. Jezičastih cevtova je ukupno 5, bele su boje, retko ljubičaste do tamnocrveno-ružičaste i najčešće su kratko trozupčasti. Plod je ahenija veličine 1,5-2 mm (Gajić, 1975). Ova biljka raste pored puta, pruge, na obroncima pored puteva, kamenitim mestima, sušnim do umereno vlažnim livadama i kserofitnim šumama. Rasprostranjena je u Evropi, Sibiru, zapadnim Himalajima, Kavkazu i severnoj Persiji. Unesena je u Severnu Ameriku, Novi Zelan i južnu Australiju, a okarakterisana je kao evro-azijski florni element (Gajić, 1975). Ekstrakti ove vrste vekovima su korišćeni u tradicionalnoj evropskoj medicini. Koristi se za tretman stomaćnih tegoba, naročito dugotrajnih stomaćnih i crevnih upala. Sokovi pripremljeni od osušene biljke su korišćeni za zaustavljanje krvarenja, dok su sveži iseckani listovi korišćeni za lečenje čireva, modrica i rana, a kupke sa ekstraktom ove biljke se

preporučuju za lečenje reumatizma i psihičke iscrpljenosti (Kuźniewski i Augustyn-Puziewicz, 2006).

2.3.2.6. PORODICA Polygonaceae

Familiji Polygonaceae čini 40 rodova i oko 800 vrsta koje su uglavnom širokog rasprostranjenja, posebno u severnoj hemisferi, a neke vrste su i kosmopolitskog karaktera. Pripadnici ove familije u flori Balkanskog poluostrva predstavljeni su sa 7 rodova i 55 vrsta od kojih su 3 vrste endemiti ovog poluostrva. Rod *Rumex* sa oko 200 vrsta rasprostranjenih u umerenoj zoni obe hemisfere. Vrste *R. acetosa*, *R. alpinus*, *R. acetosella* i *R. patientia* upotrebljavaju se kao povrće i salata.

***Rumex crispus* L. 1753** je višegodišnja zeljasta biljka visine 30-150 cm. Listovi su pomalo mesnati, lisna drška i liska su jednake dužine, donji listovi su kopljasti, a gornji linearni (slika 2.32). Cvetni pršljenovi su u rastresitim metlicama, a cvetovi su dvopolni i do dva puta kraći od cvetnih drški. Valve su jajste, srcaste sa mrežastom nervaturom i celog ili fino nazubljenog oboda. Plod je orašica zaoštrena na vrhu, smeđe boje (Slavnić, 1972). Nalazi se na vlažnim ili mezofilnim staništima u travnatoj ili ruderalnoj vegetaciji, a može da raste u močvarama i na visinama do 2300 m. Ova vrsta je rasprostranjena u Evroaziji i Americi, a i kod nas veoma česta. U azijskim zemljama ona se mnogo više koristi kao povrće. Široko se konzumira u tradicionalnoj medicini, najčešće u kontroli gljivičnih infekcija. Mladi listovi javljaju se u proleće i koriste se kao povrće, dok se seme ove biljke skuplja tokom leta i koristi se kao narodni lek (Suh i sar., 2010). Ekstrakti biljne vrste *Rumex crispus* poseduju antioksidativna, antimikrobna i antifungalna svojstva (Suh i sar., 2010). Tradicionalno koren ove biljke se koristi u tretmanu oboljenja kože, kao i za lečenje gastrointestinalnih oboljenja. Kada se konzumira od strane preživara može dovesti do dermatitisa i boli u želudcu (Shiwani i sar., 2012).



Slika 2.32. *Rumex crispus*
(<http://www.survivalplantsmemorycourse.com/wp-content/uploads/2012/11/plant22.jpg>)



Slika 2.33. *Rumex sanguineus*
(<http://www.florum.fr/img/R/9/5/6899-Rumex-sanguineus.jpg>)

***Rumex sanguineus* L. 1753** je jedna od 200 vrsta roda *Rumex* koji uključuju jednogodišnje i višegodišnje korovske biljke. Ova vrsta ima brojna narodna imena, kao što su štavalj, štavlje, krvavi kiseljak itd., a prvenstveno se gaji kao ukrasno bilje. Vrsta *R. sanguineus* je zeljasta višegodišnja biljka, uspravna, do 1 m visoka. Stablo je crvenkasto-smeđe u gornjem delu granato, tanko, fino izbrazdano (slika 2.33). Listovi su jajasto kopljasti do kopljasti, donji su na dugim drškama, sa okruglom ili srcastom osnovom, dok su gornji listovi sedeći, sa klinastom osnovom. Jednopolni cvetovi su na tankim, pri osnovi kolenastim drškama, sabrani po 6-7 u rastresite međusobno udaljene pršljene bez brakteja. Valve su dva puta kraće od plodne drške, jajasto trouglaste, meko kožaste, nejasne nervature, a samo jedna od njih ima poluloptastu bradavicu, dok su druge dve na sredini malo zadebljale. Plod je orašica koja je sitna (do 2 mm duga) i trouglasta (Slavnić, 1972). Ova biljna vrsta je rasprostranjena u vlažnim šumama i na mezofilnim livadama, ponekad uz obale voda u brdskom i gorskom pojasu. Rasprostranjena je u evroaziji i Severnoj Americi. Iako se smatra jestivom, sadrži oksalnu kiselinu, pa je ne bi trebalo konzumirati u velikim količinama. Ako se ipak pojedju veće količine, mogu nastati blagi stomahni problemi, dok pri kontaktu osetljive kože sa lišćem može doći do iritacije. Ako se koristi kao povrće, samo su mladi listovi jestivi, ukusa kao spanać ili blitva sa primesom kiselog ukusa. Stariji listovi postaju teži i gorčiji i u vreme kad dostignu potpunu zrelost nisu jestivi. Druge vrste roda *Rumex* su bolje kulinarske biljke. U medicinske svrhe ova biljka se koristi za lečenje infekcija kože, kao i za zasutavljanje krvarenja (Grieve i Leyel, 1931).

2.3.2.7. PORODICA Urticaceae

Familija Urticaceae obihvata jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, retko poludrvenaste, a znatno ređe šiblje ili drveće. Familija obuhvata oko 42 roda i preko 700 vrsta, široko rasprostranjenih po cijeloj Zemlji, a naročito u tropskoj zoni. U našoj flori nalaze se 2 roda i 6 vrsta. Rod *Urtica* spada u ovu familiju i obuhvata oko 35 vrsta. Vrste *U. dioica* i *U. urens* su kosmopolitske vrste, a *U. cannabina* se nalazi u Iranu i Sibiru, a zbog likinih vlakana upotrebljava se u industriji.

***Urtica dioica* L. 1753** je vrsta poznata pod narodnim imenom kopriva (slika 2.34). To je dugogodišnja zeljasta biljka visine 30-150 cm. Podzemno stablo ove vrste je okruglo i granasto, a nadzemno je prosto, uspravno četvorostrano pokriveno kratkim čekinjama ili dugačkim žarnim dlakama. Listovi su naspramni ili retko po tri u pršljenu, jajastog ili lancetastog oblika, a po ivici grubo testerasto nazubljeni sa poleglim kratkim dlakama na obe strane, koje su izmešane sa žarnim trihomima. Cvetno stablo nosi samo muške ili samo ženske cvetove. Muške cvasti su uspravne, a ženske su bočne i obično vise. Svi cvetovi su duži od svetne drške (Blečić, 1970).

Stanište ove vrste je raznovrsno i raste skoro svuda, oko kuća, na njivama, duž rečnih dolina, oko puteva, na vlažnim staništima, na šumskim sečinama i napuštenim dvorištima. Kopriva je skoro kosmopolitskog rasprostranjenja, jer je široko rasprostranjena od Evrope do Azije, a u Srbiji je široko rasprostranjena kao ruderalna biljka (Blečić, 1970). Mlado lišće ove biljne vrste služi kao hrana, jer je bogato vitaminima i sadrži gvožđe. Cela biljka se koristi u narodnoj medicini za lečenje alergija, kamena u bubregu, opekotina, anemije, unutrašnjih krvarenja, dijabetesa itd. Koristi se i za lečenje bola u stomaku, reumatskih bolova, prehlade i kašlja, kao protiv insuficijencije jetre, ekcema, bola u zglobovima i anemije (Gülçin i sar., 2004). Međutim, samo nekoliko ovih farmakoloških aktivnosti je i eksperimentalno dokazano. Poznata bioaktivna jedinjenja vrste *Urtica dioica* uključuju flavonoide, lignane, masne kiseline, sterole, polisaharide, karotenoide, plastocianine i lekitine (Dar i sar., 2012). Od posebnog značaja je antioksidantni efekat flavonoida, fenolne kiseline i diterpena. Istraživana je i antimikrobna aktivnost etil-acetatnih ekstrakta, koji su bili efikasni protiv svih testiranih bakterijskih izolata (Ghaima i sar., 2013).



Slika 2.34. *Urtica dioica*
(Fotografija: dr Ružica Igić)

2.3.2.8. PORODICA Alliaceae

Familija Alliaceae obuhvata oko 30 rodova i 500 vrsta. Ova porodica obuhvata i rod *Allium* koji čini oko 300 vrsta pretežno rasprostranjenih na severnoj hemisferi. Vrste *A. schoenoprasum* (vlasac), *A. sativum* (beli luk) i *A. cepa* (crni luk) su azijskog porekla. Biljke iz porodice Alliaceae na Balkanskom poluostrvu zastupljene su u okviru roda *Allium* sa oko 60 vrsta i roda *Nectaroscordium* sa dve vrste, od kojih su neke endemiti pojedinih oblasti Balkanskog poluostrva.

***Allium melananthereum* Panč. 1883** je višegodišnja zeljasta biljka, visine 20-40 cm. Lukovica je jajasta, prosta, sa izdeljenom skoro crnom spoljašnjom tunikom. Stablo je tanko, cilindrično, uspravno ili blago nagnuto, do sredine lisnato, nešto duže od lišća (slika 2.35). Lišće uzano-linearno, 1,0-1,5 mm široko, po obodu nazubljeno. Cvast mnogocvetna, rastresita sa mnogobrojnim rasplodnim lukovicama. Cvetne drške skoro sve jednake dužine. Perigon cilindričan, 7-10 mm dugačak, sa bledocrvenkastim zatupastim listićima. Prašnici znatno kraći od listića perigona. Plodnik je duguljast, a semena su sivo-mrka. Ova vrsta naseljava staništa kao što su sušni visokoplaninski pašnjaci, rasprostranjena je u Bugarskoj i južnoj Srbiji u delovima oko Vlasinskog jezera i na planinama južnije od Vranja (Tatić, 1975). U Srbiji se *A. melananthereum* može naći na Staroj planini, Besnoj kobili,

Bosilegradu, Čemerniku, Ostrozubu, Vardeniku, Vlasini, Plani, Stratoriji, kao i na Šar-planini (Anačkov, 2009). Radi se o endemičnoj vrsti Balkanskog poluostrva i njena farmakološka aktivnost nije ispitana.

***Allium fuscum* Waldst. et Kit. 1807** je višegodišnja biljka, visine 30-50 cm. Lukovica je jajasta sa mrkom tunikom. Stablo je okruglo, do polovine lisnato. Lišće je linearno, sivo, donje ravno, 2-4 mm široko, sa leđnim rebrom, rebro je čitavom dužinom ili barem pri vrhu hrapavo. Spata je dvolisna, pri osnovi proširena, 2-4 puta duža od cvasti. Cvast je mnogocvetna i rastresita (slika 2.36). Cvetne drške su nejednake dužine, 2-8 puta duže od cvetova. Perigon je 2-6 mm dugačak. Ova biljka nastanjuje krečnjačke stene i kamenjare. U Srbiji *A. fuscum* se nalazi u Banatu, u okolini Jagodine i u zapadnim delovima zemlje (Zaovine, Tara). Kao i u celoj istočnoj, južnoj i jugoistočnoj Srbiji. (Tatić, 1975). Farmakološka aktivnost ove biljke nije ispitana.

***Allium paniculatum* L. 1759 subsp. *marginatum* (Janka) So. 1972** je višegodišnja biljka, 20-60 cm visoka (slika 2.37). Lukovica je jajasta, pojedinačna, obavijena bledom ili mrkom izdeljenom tunikom. Stablo je okruglo ili ponekad brazdasto, do sredine ili i više obuhvaćeno lisnim osnovama. Lišće je linearno, sa izraženom providnom marginom širine oko 1mm. Spata je dvolisna, zelena i trajna, a cvast je mnogocvetna. Cvetne drške su nejednake dužine (10-35 mm), pri osnovi sa pripercima, za vreme cvetanja oborene naniže i sa plodovima uspravljene (slika 2.37). Perigon je 5-6 mm dugačak, listići perigona lopatičasti ili jajasti, vrhom tupi, beličasti ili mlečno beli do svetlo roze, sa izraženim tamnim prugama. Prašnički konci su jednake dužine sa listićima perigona ili nešto duži. Stubić je u početku kratak, kasnije nadvisi perigon. Stanište ove biljke su kamenjari, peščane i travnate površine nižih regiona, a rasprostranjena je u južnoj Evropi, južnoj Češkoj, Slovačkoj i Mađarskoj. U Srbiji se *A. paniculatum* subsp. *marginatum* može naći samo na Titelskom bregu (Stanojev i Boža, 1984). Farmakološka aktivnost ove biljke nije poznata.

***Allium rhodopeum* Velen. 1890** je zeljasta biljka, lukovice su ovalne, 1,5-2,2 × 1,0-1,5 mm, bez lukovice, spoljašnja tunika je braon boje, a unutrašnja je membranozna i bleđa. Lišće je olučasto, dugačko 10-30 mm, prekriveno gustim dlakama, dužine 0,3-0,8 mm. Cvast olabavljena, procvetala, sa nejednakim pedicelama, dugim 5-25 mm (slika 2.38). Spata sa dva braktealna lista, koji su uspravni, trajni, ograničeni iznad veoma dugim dlakavim dodatkom. Perigon zvonast, duguljast 5-6 mm, širok 2,0-2,7 mm, zaobljen na vrhu, sa brojnim vlaknima. Filamenti prašnika su nejednaki, beli, spoljni 1,8-2,3 mm, a unutrašnji 2,3-3,0 mm. Antera je žućkasto-bela, duga 1,0-1,2 × 0,5-0,8 mm, a plodnik zelen, dug 2,5-3,0 mm. Raste na suvim kamenitim mestima, uglavnom u senci od borovih šuma i makija, ili na severu izloženim padinama. Cveti od jula do početka avgusta. Nalazi se u južnoj Bugarskoj i severnoj Grčkoj, a u Srbiji se nalazi samo u okolini Dimitrovgrada (Tomović i sar., 2006). Farmakološka aktivnost ove biljke nije poznata.



Slika 2.35. *Allium melananthereum*
(Fotografija: dr Goran Anačkov)



Slika 2.36. *Allium fuscum*
(<http://allium.wdfiles.com/local--files/allium-f/Allium%20fuscum.jpg>)



Slika 2.37. *Allium paniculatum* subsp.
marginatum (Fotografija: dr Goran Anačkov)



Slika 2.38. *Allium rhodopeum*
(Fotografija: dr Goran Anačkov)



Slika 2.39. *Allium cepa*
(<https://www.rightplants4me.co.uk/sites/rightplants4me.co.uk/files/photo/Allium~cepa.jpg>)



Slika 2.40. *Allium sativum*
(http://www.missouriplants.com/Others/Allium_sativum_plant.jpg)

Allium cepa L. 1753 ili crni luk je višegodišnja biljka visine 60-120 cm. Lukovica je spljoštena, spljošteno ovalna ili ovalno duguljasta, obavijena crveno-mrkom tunikom. Stablo i lišće je sivo-plavičasto. Stablo je u donjem delu obično prošireno, trbušasto naduveno i šuplje. Spata je dvolisna do četvorolisna. Cvast je vrlo krupna, sa ili bez rasplodnih lukovica (slika 2.39). Cvetne drške su do 3 cm dugačke, mnogo duže od cvetova. Listići perigona su duguljasti, tupi, zelenkasto beli. Prašnici su skoro duplo duži od listića perigona, međusobno pri osnovi i sa listićima perigona srasli. Stubić neznatno viri iznad listića perigona. Plod je skoro loptast, širok, a seme je crno i naborano. Crni luk je kulturna biljka gajena u čitavom svetu, a nepoznata je u divljem stanju. Srodne vrste rastu na planinama srednje Azije i vrlo je verovatno da je u kulturu uvedena prvo u tim delovima Zemlje. Koristi se u ishrani, a ima primenu i u narodnoj medicini (Tatić, 1975). Od davnina crni luk je bio važan resurs u ishrani i jedna je od vodećih svetskih povrtarskih kultura, a takođe se koristi u medicinske svrhe. *In vitro* studije su pokazale da crni luk poseduje antibakterijsku, antiparazitsku i antifugalnu aktivnost (Bakht i sar., 2013). Biljke poseduju širok spektar sekundarnih metabolita kao što su tanini, terpenoidi, alkaloidi, flavonoidi, za koje je dokazano da poseduju antimikrobna svojstva, a crni luk je pravi primer za to (Shinkafi i Dauda, 2013). Crni luk poseduje mnoge biološke aktivnosti, uključujući antimikrobnu, imunomodulatornu, antioksidantnu, probiotsku aktivnost, antikancerogenu i antimutagenu. Koristi se kod kardiovaskularnih bolesti zbog njegovih antitrombotskih i anti-hipertenzivnih efekata, a ima i antidijabetički efekat (Corzo-Martinez i sar., 2007). Biološki efekti različitih sastojka crnog luka, kao što su lektini, prostaglandini, fruktani, pektini, adenzin, vitamini B1, B2, C i E, masne kiseline, glikolipidi, fosfolipidi i esencijalne amino-kiseline, proučavani su više decenija (Corzo-Martinez i sar., 2007).

Allium sativum L. 1753 ili beli luk je višegodišnja biljka visine 25-90 cm. Lukovica je jajasta i složena, sastavljena od 7-30 sitnih lukovica obavijenih opnastom, beličastom tunikom. Bočne lukovice su ovalno jajaste, 2,5-4 cm dužine, obavijene belom, crvenkastom ili ljubičastom ljuspom. Stablo je uspravno i do polovine lisnato. Lišće je širokolinearno, ravno, obodom hrapavo i do 12 mm široko. Spata je jednodelna i vrlo dugačka. Cvast se sastoji iz malog broja cvetova, sa mnogobrojnim do 1 cm krupnim rasplodnim lukovicama (slika 2.40). Cvetovi se nalaze na dugačkim drškama, a listići perigona su crvenkastobeli ili zelenkasti. Prašnici su kraći od listića perigona.

Beli luk je kulturna biljka gajena po čitavoj Zemlji. Postojbina joj je srednja Azija. Gajila se još u starom Egiptu pre 3000-4000 godina. To je važna začinska biljka, koristi se u ishrani kao salata u svežem stanju ili kao začim jelima. Lukovice se upotrebljavaju i kao narodni lek, naročito kao profilaktično sredstvo protiv epidemija. Glikozid alin ispoljava antibiotska svojstva (Tatić, 1975).

Sa više od 200 hemijskih supstanci u svom sastavu, ima kapacitet da štiti ljudsko telo od mnogih bolesti. Iako bi trebao da se konzumira kao svež, neki istraživači smatraju da kuvani

ekstrakti i ulja mogu obezbediti bolju zaštitu od slobodnih radikala i infekcija nego sveži luk. Beli luk kao antibakterijski agens je efikasan protiv mnogih Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija kao što su *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*. Ovaj efekat potiče od sumpora i bioflavonoida kao što su kvercetin i cianidin koji imaju ulogu u sprečavanju infekcije. Aktivne supstance poput alistina su moćni agensi protiv stafilokoka i *E. coli*. U tradicionalnoj medicini, beli luk se koristi u različitim oblicima za lečenje skoro svih infekcija (Goncagul i Ayaz, 2010). Tokom Olimpijskih igara u Grčkoj sportisti su ga koristili kao stimulans, dok se u Indiji vekovima koristi kao antiseptik za rane i losion. U ratovima se beli luk koristio kao antiseptik u prevenciji pojave gangrene. Drugi karakteristični sastojci belog luka uključuju aliksin i organski vezan selen. Ova hemijska jedinjenja pokazuju nekoliko bioloških efekata, uključujući smanjenje holesterola i prevenciju karcinoma, a smatra se da deluju sinergistički sa organskim sumpornim jedinjenjima (Corzo-Martinez i sar., 2007).

2.3.3. ETARSKA ULJA

Etarska ulja su smeše mirisnih, isparljivih i lipofilnih supstanci, i mogu se naći samo kod 10 % vrsta biljnog carstva (Djilani i Dicko, 2012). Skladištena su u specijalnim krtim sekretornim strukturama biljaka, kao što su žlezde, sekretorne dlake, sekretorni kanali, sekretorne šupljine ili smoni kanali (Ahmadi i sar., 2002; Gershenzon, 1994; Liolios i sar., 2010; Wagner, 1996). Ukupan sadržaj etarskih ulja u biljkama je generalno veoma nizak i retko prelazi 1 % ukupne mase biljke (Bowles, 2003). Karakteriše ih osobina hidrofobnosti, zbog čega su slabo rastvorljiva u vodi. Mogu se rastvoriti u akoholu, nepolarnim ili slabo polarnim rastvaračima, voskovima i uljima. Većina etarskih ulja je bezbojna ili blede žute do žute boje, tečna su i imaju manju gustinu od vode (Gupta i sar., 2010; Martin i sar., 2010). Metode koje se najčešće koriste za izolaciju etarskog ulja iz biljnog materijala su destilacija (najčešće hidrodestilacija i destilacija vodenom parom), ekstrakcija primenom rastvarača (eng. *solvent extraction*), takođe se koriste i metode ekstrakcije superkritičnim fluidima (tečni CO₂) kao i mehaničko ceđenje i presovanje, dok se za analizu sastava etarskih ulja najčešće koriste metode gasne hromatografije (Marriott i sar., 2001). Komponente etarskih ulja mogu biti veoma perspektivni biološki aktivni agensi, pogodni za eksploataciju i višenamensku upotrebu (Ormancey i sar., 2001; Sawamura, 2000). Veliki broj etarskih ulja poseduje veoma različite biološke aktivnosti kao što su antiinflamatorna, sedativna, digestivna, antimikrobna, antiviralna, antioksidantna aktivnost, itd. (Yap i sar., 2014).

Etarska ulja su složene, kompleksne smeše velikog broja različitih jedinjenja. Većina ovih jedinjenja je izoprenoidnog porekla (Prabuseenivasan i sar., 2006). Sve komponente etarskih ulja se mogu klasifikovati u četiri kategorije: terpeni (monoterpenski ugljovodonici i seskviterpenski ugljovodonici), terpenoidi (oksidovani monoterpeni i oksidovani

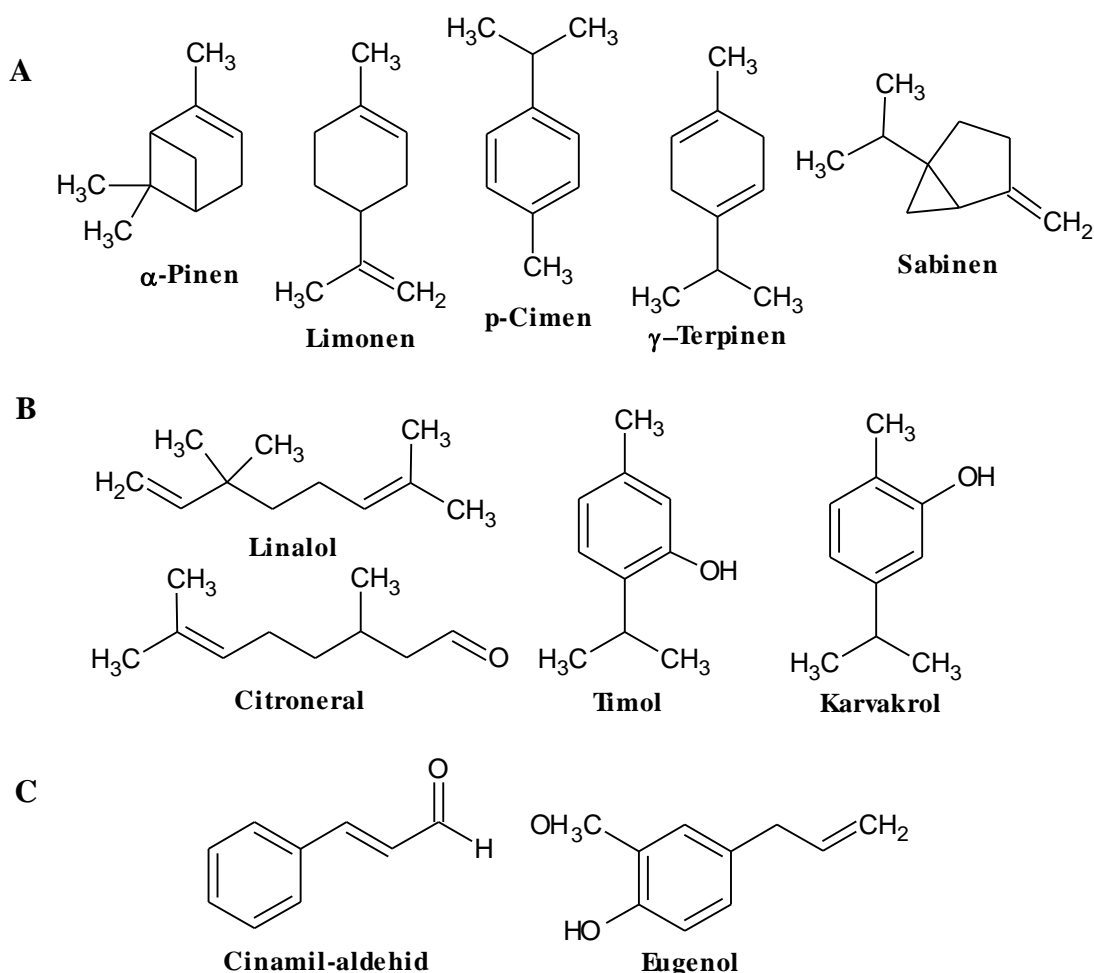
seskviterpeni), fenilpropanoidi i ostale komponente (Hyldgaard i sar., 2012; Andrade i sar., 2011; De Sousa, 2011), ali u upotrebi je takođe i podela komponenti etarskih ulja na ugljovodonike i oksidovane komponente (Akhila, 2006; Halm, 2008; Hunter, 2009). Faktori životne sredine imaju veliki uticaj na hemijski sastav etarskih ulja (Scora, 1973). Aromatičnost i hemijski sastav etarskih ulja mogu varirati u zavisnosti od geo-klimatske lokacije i uslova staništa, uključujući koncentraciju hranljivih materija, temperaturu, vlažnost, tip zemljišta, dužinu dana, klimu, nadmorsku visinu, količinu dostupne vode, itd. Hemijski sastav takođe zavisi od sezone ili vegetacijskog perioda biljke (npr. pre ili posle cvetanja), kao i dela biljke koji se koristi za ekstrakciju (Andrade i sar., 2011). U zavisnosti od svih navedenih faktora, biosintetski putevi biljaka se mogu menjati, pa i relativan sadržaj komponenti etarskog ulja može da varira. Ove varijacije u hemijskom sastavu dovele su do uvođenja pojma *hemotip*, koji generalno podrazumeva populaciju u okviru jedne biljne vrste koja ima drugačiji hemijski profil sekundarnih metabolita (Djilani i Dicko, 2012). Na osnovu sastava etarskog ulja karakterističnog za određeni hemotip može se odrediti poreklo biljke i stepen vegetacijskog ciklusa biljke (Bradesi i sar., 1997). Osim toga, genotip biljke predstavlja možda i najvažniji faktor koji utiče na hemijski sastav etarskog ulja (Djilani i Dicko, 2012). Dakle, svi ovi faktori - biotop, genetski i epigenetski faktori, utiču na biohemijsku sintezu etarskog ulja u određenoj biljci. Iz tog razloga, ista biljna vrsta može proizvoditi etarska ulja različitog hemijskog sastava, zbog čega se i njihova biološka aktivnost može bitno razlikovati. Braun i Choen (2010) su preporučili koja etarska ulja se smatraju bezbednim, čak i za primenu u trudnoći, a koja etarska ulja treba pažljivo koristiti ili ih čak izbegavati (prilog 9.1). Takođe, Lis-Balchin (2006) i Istraživački institut za aromatične materijale (eng. *Research Institute for Fragrance Materials* - RIFM) preporučili su bezbedne doze prilikom primene etarskih ulja određenih biljnih vrsta (prilog 9.2). Proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka mogu imati sličnu aktivnost kao neki endogeni metaboliti, ligandi, hormoni, molekuli signalne transdukcije i neurotransmiteri. Upravo usled ovakve aktivnosti, sekundarni metaboliti biljaka mogu ispoljiti lekovite efekte na ljude. Iz toga razloga, a u cilju pronalaženja novih biološki aktivnih jedinjenja važno je konstantno vršiti skrining hemijskog sastava do sada neispitanih biljnih vrsta.

2.3.3.1. BIOLOŠKI AKTIVNE KOMPONENTE ETARSKIH ULJA

Lekovito delovanje biljaka uglavnom je rezultat zajedničkog delovanja više različitih sekundarnih metabolita, koji mogu biti iz klase alkaloida, steroida, tanina, fenola itd., koje se sintetišu i skladište u specifičnim delovima ili svim delovima biljke (Djilani i Dicko, 2012). Ove komponente su često specifične za određene taksone, kao što su familija, rod i vrsta. Kombinacija sekundarnih metabolita u biljci predstavlja važnu taksonomsku karakteristiku (Capasso i sar., 2003). Mnoge biološki aktivne komponente etarskih ulja poseduju

antimikrobnu aktivnost. Neka od ovih jedinjenja su uvek prisutna u biljci, dok su druga proizvodjena kao odgovor na invaziju mikroorganizama ili fizičku povredu (Roller, 2003). Konstituenti etarskih ulja se veoma razlikuju po antimikrobnoj aktivnosti.

Terpeni pripadaju klasi izoprenoida, jedinjenja lipofilnog karaktera čije se strukture mogu izvesti povezivanjem C5-izoprenskih jedinica (C₅H₈). Prema njihovom broju dele se na: hemiterpene, monoterpene, diterpene, sesterterpene, triterpene, tetraterpene i politerpene. Sva ova jedinjenja imaju isto biogenetsko poreklo i nastaju kombinacijom biogenetskih izoprenskih jedinica (IPP i DMAPP). U etarskim uljima dominiraju niži terpeni sa 10, odnosno 15-ugljenikovih atoma, iz klase mono- i seskvitpena (C₁₀H₁₆ i C₁₅H₂₄). Ove grupe se dalje dele na alifatične i aromatične, mono- i biciklične, a u zavisnosti od stepena oksidacije na ugljovodonike, alkohole, estre, etre, laktone glikozide i dr. Primeri terpenskih jedinjenja koja se često detektuju u etarskim uljima su p-cimen, D-limonen, različiti izomeri terpinena, sabinen i α- i β-pinen (slika 2.41A).



Slika 2.41. Hemijske strukture nekih biološki aktivnih komponenti etarskih ulja*
(A-terpeni, B-terpenoidi, C-fenilpropanoidi)

* Strukturne formule bioaktivnih komponenti su nacrtane primenom softverskog programa ACD/ChemSketch.

Terpenoidi su terpeni koji su podlegli biohemijskim enzimskim modifikacijama, kao što su hidroksilacije, oksidacije, esterifikacije, glikozilacije ili premeštanje ili uklanjanje metil grupe (Caballero i sar., 2003). Terpenoidi se dele na alkohole, estre, aldehide, ketone, etre, fenole i epoksidge. Primeri ovih komponenti etarskih ulja su timol, karvakrol, linalol, linalil-acetat, citroneral, piperiton, mentol i geraniol (slika 2.41B).

Fenilpropanoidi (C6-C3) predstavljaju značajnu klasu fenolnih jedinjenja, a u biljkama nastaju iz fosfoenolpiruvata i eritroza-4 fosfata putem šikimske kiseline. Direktni prekursor je aminokiselina fenilalanin iz koje nastaje cimena kiselina koja podleže reakcijama hidroksilacija, metilacija, esterifikacija idr. Neki derivati su lako isparljivi i daju specifičnu aromu biljkama u kojima se nalaze. najznačajniji su: eugenol, izoeugenol, vanilin, šafrol, anetol i cinamil-aldehid (slika 2.41C).

Ostale komponente etarskih ulja su vrlo raznovrsne. Naime, etarska ulja sadrže veliki broj različitih jedinjenja, od prostih alifatičnih ugljovodonika, alkohola i estara pa do produkata nastalih degradacijom nezasićenih masnih kiselina, i isparljivih jedinjenja koja sadrže sumpor i azot (Caballero i sar., 2003).

Antimikrobna aktivnost pojedinačnih komponenti etarskih ulja je potvrđena u velikom broju studija (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010, Oyedemi i sar., 2009; Randrianarivelo i sar., 2009). Tako na primer, 1,8-cineol, linalol, eugenol, α -terpineol i γ -terpinen, poseduju snažan bakteriostatski i baktericidni efekat protiv Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (Oyedemi i sar., 2009; Randrianarivelo i sar., 2009). Linalol je ispoljio antibakterijsku aktivnost protiv Gram pozitivnih (*M. luteus* ATCC 10240, *B. subtilis* ATCC 6633 i *S. aureus* ATCC 6538) i Gram negativnih (*E. coli* 363, *V. anguillarum* ATCC 19264, *V. harveyi* ATCC 14126, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. fisheri* ATCC 49387 i *S. typhimurium* ATCC 14028) bakterijskih vrsta pri MIC vrednostima 0,18-5,88 mg mL⁻¹ i MBC vrednostima 0,18-11,75 mg mL⁻¹, dok su za 1,8-cineol MIC vrednosti protiv istih bakterijskih vrsta bile u opsegu 0,37-11,75 mg mL⁻¹, a MBC 0,73-11,75 mg mL⁻¹ (Randrianarivelo i sar., 2009). Takođe je dokazana značajna aktivnost limonena (0,17-2 %), 1,8-cineola (2-16 %) i α -pinena (1-16 %) protiv *H. pylori* (Zanetti i sar., 2010).

2.3.4. BILJNI EKSTRAKTI

Iako se biljni ekstrakti kao i etarska ulja dobijaju iz biljaka, među njima postoji značajna razlika u smislu njihove čistoće, hemijskog sastava i procesa dobijanja. Biljni ekstrakti su farmaceutski preparati koji se dobijaju iz osušenih ili svežih biljaka primenom odgovarajućih ekstrakcionih postupaka (Capasso i sar., 2005). Biljni ekstrakti mogu biti tečni, polučvrsti i čvrsti, pri čemu su bioaktivne komponente zastupljene u većem procentu kod polučvrstih ili čvrstih ekstrakata. Tečni ekstrakti se mogu koristiti u obliku kapi, ili češće u obliku sirupa, a takođe se mogu poboljšati dodavanjem voćnog soka (npr. sok od šljiva pojačava terapeutsko

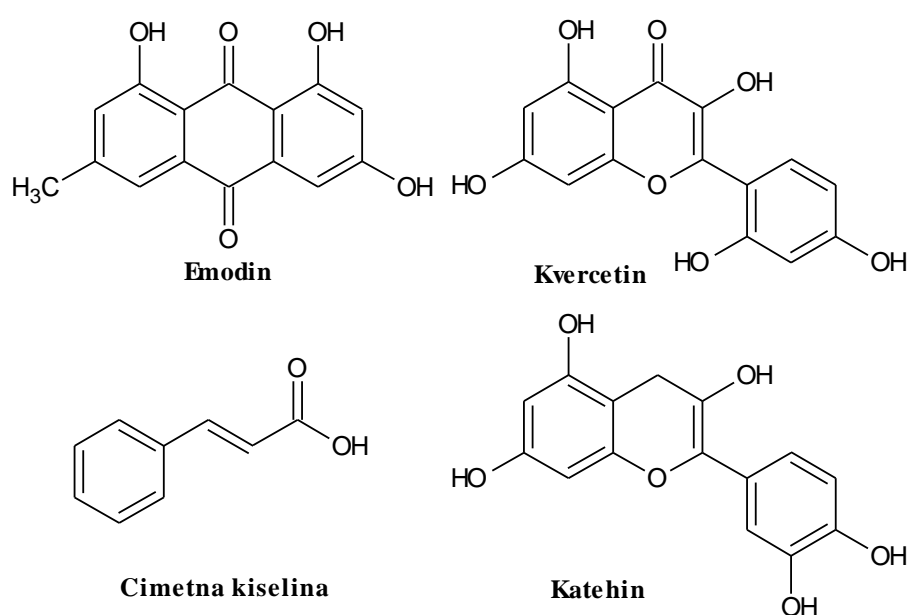
dejstvo laksativa, sok od kruške pojačava lučenje žuči (holagog), a sok od višnje čini diuretik efikasnijim). Ekstrakti se dele na infuze (biljni ekstrakt dobijen prelivanjem droge ključalom vodom), dekokte (vodeni biljni ekstrakt dobijen potapanjem i kuvanjem grubljih delova biljke, kore, bobica, ploda, korena i semena, čije se komponente ne ekstrahuju lako) i tinkture (vodeno-alkoholni ekstrakt neke droge) (Capasso i sar., 2003). Pored tradicionalnih farmaceutskih ekstrakata, pripremljenih upotrebom vode, etanola ili u smeši vode i alkohola, danas se mnogi ekstrakti prave sa glicerinom i drugim organskim rastvaračima. U etanolnim ekstraktima često dominiraju polifenolna jedinjenja kao što su tanini, flavonoidi, proantocijanidini itd. Kao i u slučaju etarskih ulja, hemijski sastav ekstrakata varira u zavisnosti od delova biljke iz kojih je ekstrakt pripremljen, kao i polarnosti primenjenog ekstragensa. Najčešće korišćeni rastvarači su voda, alkohol (metanol ili etanol), etil acetat, dietiletar i hloroform. Tuberoso i sar. (2010) su pokazali da etanolni i vodeni ekstrakti imaju veću količinu ekstrahovanih komponenti u poređenju sa etilacetatnim ekstraktima, dok je veća antiradikalska i antioksidantna aktivnost zabeležena za etanolne i etilacetatne ekstrakte. Takođe, etanolni ekstrakti imaju najveći sadržaj fenolnih komponenti, što je u korelaciji sa antiradikalnom i antioksidantnom aktivnošću ekstrakata (Tuberoso i sar., 2010).

2.3.4.1. BIOLOŠKI AKTIVNE KOMPONENTE BILJNIH EKSTRAKATA

Za razliku od etarskih ulja, u sastav biljnih ekstrakata najčešće ulaze polifenolna jedinjenja (slika 2.42). Fenolne kiseline koje se često nalaze u biljnim ekstraktima su cimetna kiselina, p-kumarinska, kafena kiselina, vanilinska kiselina, ferulna kiselina i druge. Cimetna i kafena kiselina su najčešći predstavnici velike grupe komponenti fenil-propanoidnih derivata. Za kafenu kiselinu, koja je prisutna npr. u ekstraktima estragona i timijana, dokazano je da je efikasna protiv virusa, bakterija i gljiva. Takođe, za fenolne alkohole katehol i pirogalol dokazano je da deluju toksično na mikroorganizme. Katehol poseduje dve hidroksilne grupe, a pirogalol tri i pretpostavlja se da je položaj i broj hidroksilnih grupa na fenolnom prstenu u vezi sa njihovom relativnom toksičnošću za mikroorganizme, pošto povećana hidroksilacija rezultuje povećanom toksičnošću. Još neki autori su pokazali da fenoli sa najvećim stepenom oksidacije uzrokuju inhibiciju mikroorganizama u najvećoj meri (Ciocan i Bara, 2007).

Hinoni su oksidovani homolozi aromatičnih derivata koji u osnovi imaju o- ili p-hinonsku strukturu. Prema složenosti dele se na benzohinone, naftahinone i antrahinone. Ova jedinjenja su odgovorna za pojavu braon boje na mestima površinskih povreda voća i povrća. Značajna je njihova uloga kao intermedijera u biosintezi pigmenta melanina, gde se kombinuju sa L-DOPA gradeći dopahinon. Hinoni se lako oksiduju, a poznato je i da formiraju ireverzibilne komplekse sa nukleofilnim amino kiselinama u proteinima, često dovodeći do gubitka funkcije ili inaktivacije proteina (Ciocan i Bara, 2007). Iz tog razloga,

potencijalni opseg antimikrobnog delovanja hinona je veliki. Moguće mete hinona u ćelijama mikroorganizama su površinski adhezini, polipeptidi ćelijskog zida i enzimi vezani za membranu. Hinoni takođe mogu reagovati sa potencijalnim izvorima hranljivih materija za mikroorganizme i činiti ih nedostupnim za mikroorganizme. Kazmi i sar. (1994) su izolovali derivat antrahinona (1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metil antrahinon) iz biljke *Cassia italica*, koji je ispoljio bakteriostatsku aktivnost protiv *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum*, *Pseudomonas pseudomalliae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Hipericin je naftodiantronski derivat iz biljke *Hypericum perforatum* kome je posvećeno mnogo pažnje u popularnoj štampi zbog antidepresivnog delovanja, a Duke (1985) je dokazao da ovo jedinjenje poseduje i antimikrobna svojstva.



Slika 2.42. Hemijske strukture nekih polifenolnih jedinjenja zastupljenih u biljnim ekstraktima*

Flavonoidi predstavljaju veliku klasu biljnih fenola koje karakteriše C6-C3-C6 skelet, koji može biti oksidovan u različitom stepenu. Prema stepenu oksidacije podeljeni su u dvanaest klasa. Od kojih su najrasprostranjeniji, flavonoli, flavoni i flavanoli. Široko rasprostranjeni aglikoni flavonoida su kvercetin, apigenin, kemferol, miricetin i dr. (Wannes i sar., 2010; Tuberoso i sar., 2010) (slika 2.42). U biljkama se često nalaze u obliku glikozida radi lakšeg transporta kroz sisteme provodnih sudova. Jedan od najrasprostranjenijih glikozida je rutin (kvercetin- 3-O rutinozid). Poznato je da se u biljkama sintetišu između ostalog i kao odgovor na mikrobnu infekciju, zbog čega njihova *in vitro* efikasnost kao antimikrobnih agenasa protiv širokog spektra mikroorganizama ne predstavlja iznenađenje. Aktivnost flavonoida je najverovatnije posledica njihove sposobnosti da formiraju komplekse

* Strukturne formule bioaktivnih komponenti su nacrtane primenom softverskog programa ACD/ChemSketch.

sa ekstracelularnim i solubilnim proteinima i da formiraju komplekse sa ćelijskim zidom bakterija, kao što je već opisano za hinone. Lipofilniji flavonoidi takođe mogu narušavati membrane mikroorganizama. Potrebno je posebno spomenuti katehine iz grupe flavan-3-ola, koji imaju najmanji stepen oksidacije prstena C, tj umesto γ -pironskog prstena imaju dihidropiranski centralni prsten. Katehini su monomrene jedinice kondenzovanih tanina i u većim količinama nalaze se u zelenom čaju gde su velikim delom odgovorni za antimikrobnu aktivnost i ostala lekovita svojstva. Dokazano je da ova grupa jedinjenja u *in vitro* uslovima inhibira rast *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* sp., kao i drugih bakterija i mikroorganizama. Flavonoidne komponente takođe ispoljavaju inhibitorne efekte na različite viruse (Ciocan i Bara, 2007).

Tanini su grupa fenolnih jedinjenja, koji generalno imaju sposobnost da štave kožu i da precipitiraju želatin iz rastvora, a ovo svojstvo je poznato kao astrigencija. Mogu se naći u skoro svim delovima biljaka (grana, stablo, list, plod i koren). Podeljeni su u dve grupe: hidrolizujuć i kondenzovani tanini. Hidrolizujuć tanini ili galotanini su su polimerni estri galne kiseline i ugljenih hidrata (najčešće D-glukoze), dok brojniji kondenzovani tanini (često se nazivaju i proantocijanidini) predstavljaju polimere flavonoida. Kondenzovani tanini se formiraju kondenzacijom derivata flavan-3-ola (katehina) i flavan-3,4-diola Takođe, tanini mogu nastati polimerizacijom jedinica hinona (Geissman, 1963). Ovoj grupi jedinjenja poslednjih godina poklonjena je velika pažnja od kada je predloženo konzumiranje napitaka koji sadrže tanine. Naime, mnoge biološke aktivnosti, kao što su stimulacija ćelijske fagocitoze, domaćinom posredovana antitumorska aktivnost i širok opseg anti-infektivnog delovanja, pripisane su taninima. Može se pretpostaviti da ova jedinjenja imaju sposobnost inaktivacije mikrobnih adhezina, enzima, transpotrnih proteina ćelijskih omotača itd. Antimikrobni značaj ovih specifičnih aktivnosti nije detaljno objašnjen. Scalbert je 1991. godine, sumirao podatke o antimikrobnim svojstvima tanina. On je nabrojao 33 studije koje su dokumentovale antimikrobnu aktivnost tanina do tada. Prema ovim izveštajima, tanini mogu biti toksični za filamentozne gljive, kvasce i bakterije. Utvrđeno je da se kondenzovani tanini vezuju za ćelijski zid bakterija u buragu preživara, sprečavajući bakterijski rast i proteaznu aktivnost (Jones i sar., 1994).

Kumarini su fenolna jedinjenja za čiju strukturu su karakteristični kondenzovani spojeni benzenov i α -pironski prsten. Po hemijskom sastavu to su laktoni 2-hidroksi cimetine kiseline. Oni su npr. odgovorni za karakterističan miris sena, a od 1996. godine otkriveno je najmanje 1300 kumarina. Poznati su po svojoj antikoagulantnoj (dikumarol) , antiinflamatornoj i vazodilatornoj aktivnosti (Namba i sar., 1988). Thornes je 1954. godine tražio agens za lečenje vaginalne kandidijaze kod trudnica i pronašao je da kumarin u *in vitro* uslovima inhibira rast vrste *Candida albicans*. Kasnije su opisani estrogenski efekti kumarina (Livingston i sar., 1964). Kumarini spadaju u grupu fitoaleksina, supstanci koje biljke sintetisu kao odgovor na infekcije nekim patogenima. Tako se neki kumarini sintetisu u

šargarepi kao odgovor na gljivičnu infekciju, na osnovu čega se pretpostavlja da poseduju antifungalnu aktivnost, dok je njihova antibakterijska aktivnost detektovana u ekstraktima biljke *Galium odoratum* (L.) Scop. (Thomson, 1978). Međutim, podaci o specifičnim antibiotskim svojstvima kumarina su i dalje oskudni, iako mnogi publikovani radovi ukazuju da ova jedinjenja mogu imati potencijalno korisno delovanje na zdravlje ljudi.

Kao u i slušaju etarskih ulja, postoje studije koje potvrđuju antimikrobnu aktivnost pojedinačnih komponenti biljnih ekstrakata (Shan i sar., 2007; Rauha i sar., 2000; Boiteux i sar., 2014). Dokazano je da flavonoidi kvercetin i naringenin inhibiraju rast devet različitih vrsta mikroorganizama (*Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*) (Rauha i sar., 2000). Takođe, naringenin, cimetna kiselina i luteolin doprinose antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata vrsta *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Matricaria recutita* i *Larrea divaricata* na miceliju *Phytophthora nicotianae*, *P. citrophthora* i *P. palmivora* (Boiteux i sar., 2014).

Kompleksnost hemijskog sastava biljnih ekstrakata, a takođe i etarskih ulja, ukazuje na sinergističko dejstvo više jedinjenja putem različitih mehanizama, što dodatno otežava identifikaciju samo jednog jedinjenja i jednog mehanizma njihove aktivnosti na molekularnom nivou.

2.3.5. MEHANIZAM DELOVANJA NEKONVENCIONALNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA

Različiti mehanizmi delovanja su uključeni u antimikrobnu aktivnost etarskih ulja i biljnih ekstrakata, odnosno njihovih biološki aktivnih komponenti. S obzirom na kompleksnost njihovog hemijskog sastava, vrlo je verovatno da je antimikrobna aktivnost etarskih ulja i biljnih ekstrakata rezultat više mehanizma delovanja. Smatra se da ove komponente imaju nekoliko ciljnih mesta delovanja na ćelijskom nivou. Generalno, mehanizmi rezistencije na nekonvencionane antimikrobne agense, prvenstveno etarska ulja i biljne ekstrakte, a koji se najčešće navode u literaturi su sledeći:

- (1) dezintegracija ćelijske membrane,
- (2) interakcija sa membranskim proteinima (ATP-azama i drugim proteinima),
- (3) narušavanje strukture spoljašnje membrane Gram negativnih bakterija uz oslobađanje lipopolisaharida,
- (4) destabilizacija elektrohemijjskog gradijenta protona uz curenje (eng. *leakage*) jona iz ćelije,
- (5) koagulacija ćelijskog sadržaja, i
- (6) inhibicija sinteze enzima (Bassolé i Juliani, 2012; Hyltdgaard i sar., 2012; Di Pasqua i sar., 2007; Ultee i sar., 2002).

Nekovneacionalni agensi najčešće utiču na membranske strukture bakterijske ćelije. Permeabilnost ćelijskog zida i ćelijskih membrana bakterija se menja delovanjem etarskih ulja i biljnih ekstrakata, što dovodi do osobađanja intracelularnog sadržaja iz ćelije. Ovo može biti praćeno i remećenjem membranskih funkcija, kao što je transfer elektrona, enzimska aktivnost ili apsorpcija hranljivih materija (Amensour i sar., 2010). Oyedemi i sar. (2009) su pokazali da komponente etarskih ulja (eugenol, α -terpineol i γ -terpinen) ispoljavaju baktericidni efekat protiv Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija putem narušavanja membranskog sistema bakterija. Važna karakteristika komponentata etarskih ulja je hidrofobnost, koja im omogućava rastvaranje lipida ćelijske membrane bakterija, što remeti ćelijsku strukuru i čini ćeliju propustljivijom. Za timol je dokazano da pored narušavanja membranske strukture bakterijskih ćelija, ima i potencijalno delovanje unutar ćelije, kao što je narušavanje citratnog metaboličkog puta (Di Pasqua i sar., 2007, 2010; Trombetta i sar., 2005). Karvakrol, destabilizuje membrane bakterija, i inhibira aktivnost ATPaza, što dovodi do curenja ćelijskih jona, fluidizacije membranskih lipida i elektrohemijskog gradijenta protona (Di Pasqua i sar., 2007; Gill i Holley, 2006a, b; Ultee i sar., 2002). Komponente biljnih ekstrakata, kao što su flavonoidi poseduju sposobnost formiranja kompleksa sa ekstracelularnim solubilnim proteinima, kao i sa ćelijskim zidom bakterija (Tsuchiya i sar., 1996; Cushine i Lamb, 2005). Katehini ispoljavaju antibakterijski efekat putem inhibicije DNK giraze. Zapravo, dokazano je da se određeni katehini specifično vezuju za N-terminalni fragment giraze B (Gradisar i sar., 2007). Osim toga, katehini mogu obnoviti osetljivost bakterija na antibiotike, kao što su tetraciklini, β -laktami i inhibitori β -laktamaza (Zhao i sar., 2003). Opšte je poznato da su Gram negativne bakterije rezistentnije na etarska ulja i biljne ekstrakte u odnosu na Gram pozitivne (Prabuseenivasan i sar., 2006; Randrianarivelo i sar., 2009). Ova rezistencija je verovatno posledica građe ćelijskog zida Gram negativnih bakterija, čija spoljašnja membrana usporava prolaz aktivnih biljnih komponenti (Inouye i sar., 2001). Međutim, postoji i manji broj studija u kojima nisu utvrđene razlike u osetljivosti ove dve grupe bakterija ili su čak Gram negativne vrste okarakterisane kao osetljivije. Tako na primer nije detektovana očigledna razlika u osetljivosti između Gram pozitivnih (*Bacillus subtilis* MTCC 441 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) i Gram negativnih (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 15380, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* MTCC 1771) bakterijskih vrsta na 21 testirano etarsko ulje (Prabuseenivasan i sar., 2006). U drugoj studiji je pokazano da su Gram pozitivne bakterije rezistentnije na etarska ulja od Gram negativnih (Zaika, 1988).

Primena kombinacija različitih antimikrobnih agenasa, koji imaju više ciljnih mesta u bakterijskoj ćeliji, predstavlja još jedan potencijalan način lećenja bakterijske infekcije. Antibiotici primenjeni u kombinaciji sa etarskim uljima, biljnim ekstraktima ili njihovim aktivnim supstancama, deluju na rezistentne bakterije posredstvom različitih mehanizama, što predstavlja nove opcije u prevazilaženju problema bakterijske rezistencije. Interakcija između

agenasa koji se kombinuju može kao rezultat ostvariti četiri tipa efekta: indiferentni, aditivan, antagonistički i sinergistički efekat (Burt, 2004). Aditivan efekat se dobija kada je efekat agenasa u kombinaciji jednak sumi pojedinačnih efekata koje ostvaruje svaki od agenasa. Antagonizam nastaje kada je efekat jednog ili oba agensa slabiji kada se primenjuju u kombinaciji u odnosu na efekat koji ostvaruju pojedinačno. Sinergizam se javlja kada je efekat agenasa u kombinaciji veći od sume efekata koje agensi ostvaruju pojedinačno (Burt, 2004), dok se odsustvo interakcije između agensa definiše kao indiferentan efekat. Najčešće korišćen metod za ispitivanje interakcija među antimikrobnim agensima je dvodimenzionalni, dvo-agensni mikrodilucioni metod (eng. *two-agent broth microdilution checkerboard assay*), za procenu efekta kombinacije antimikrobnih agenasa protiv mikroorganizama nakon određenog vremena. *In vitro* interakcije se izračunavaju algebarski, što podrazumeva izračunavanje indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (FIC indeks ili FICI) za dva testirana agensa. FIC indeks predstavlja sumu odnosa inhibitorne koncentracije jednog agensa sa inhibitornom koncentracijom kombinacije agenasa i odnosa inhibitorne koncentracije drugog agensa sa inhibitornom koncentracijom agenasa u kombinaciji. Izračunate interakcije (FICI) mogu biti predstavljene i geometrijski – izobologramima (EUCAST, 2000). Osim ovog metoda, za preciznije određivanje efekta kombinacije agenasa koristi se metod kinetike inhibicije rasta (eng. *time-kill method*), koji podrazumeva praćenje broja vijabilnih bakterijskih ćelija u tečnom medijumu u prisustvu određene kombinacije antimikrobnih agenasa tokom određenog vremenskog perioda, tj. u različitim vremenskim tačkama. Za razliku od prethodnog metoda, ovaj metod nije široko primenjivan u ispitivanju antibakterijskih interakcija, ali i pored toga može se smatrati klinički relevantnim modelom ako testirane koncentracije predstavljaju one koje se mogu postići i primeniti i na mestu infekcije (Pillai i sar., 2005). Zbog činjenice da ovaj metod podrazumeva prebrojavanje bakterijskih kolonija u većem broju vremenskih tačaka, kao i potrošnju velike količine materijala, smatra se vremenski i materijalno neefikasnim i time ograničava broj testiranih koncentracija i kombinacija antimikrobnih agenasa (EUCAST, 2000).

Kombinovana terapija je relativno novi koncept. Međutim, većina studija koja obrađuje ovu problematiku detektovale su postojanje sinergizma *in vitro*, ne ispitujući do kraja osnovne mehanizme ove zajedničke aktivnosti. Imajući u vidu da većina komponenti etarskih ulja ispoljava opšte štetne efekte na ćelijsku membranu bakterija (Helander i sar., 1998; Ultee i sar., 2002) i da većina antibiotika ima specifične ciljne molekule uključene u sintetske procese u ćeliji, vrlo je verovatno da je sinergizam u većini slučajeva posledica multi-targetnog efekta. U cilju unapređenja efikasnosti antibiotika neophodno je ponaći način za poboljšanje prolaska antibiotika kroz bakterijske membrane i/ili onesposobiti efluksne pumpe koje su glavni mehanizam rezistencije Gram negativnih bakterija (Bolla i sar., 2011). Postoje dokazi o sinergizmu konvencionalnih antibiotika i biološki aktivnih komponenti biljaka, usled koga dolazi do smanjenja bakterijske rezistencije inhibicijom efluksnih pumpi bakterija

(Kollanoor Johny i sar., 2010; Lorenzi i sar., 2009; Shahverdi i sar., 2007). Utvrđeno je da efluksne pumpe mogu biti inhibirane disrupcijom membrane i inhibicijom metaboličkih puteva bakterijske ćelije od strane nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa (Gibbons, 2008). Mehanizmi koji mogu dovesti do farmakološkog sinergizma konvencionalnih i nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa su: (1) multi-targetni efekat u kome komponente imaju različita ciljna mesta na bakterijskoj ćeliji, (2) farmakokinetički ili fizičko-hemijski efekti (npr. poboljšanje rastvorljivosti ili biološke dostupnosti), (3) efekat narušavanja specifičnog bakterijskog mehanizma rezistencije (Hemaiswarya i sar., 2008; Wagner i Ulrich-Merzenich, 2009; Burt, 2004). Sinergizam posredstvom farmakokinetičkih ili fizičko-hemijskih efekata je detektovan i kod jedinjenja koja primenjena samostalno nisu aktivna, kao što je na primer slučaj p-cimenom, koji pokazuje aktivnost tek u prisustvu karvakrola, tako što se akumulira u bakterijskim membranama i remeti njihovu fizičko-hemijsku strukturu (Ultee i sar., 2012). Osim toga, utvrđeno je da pojedini nekonvencionalni antimikrobni agensi, iako ne poseduju značajan inhibitorni efekat kada se koriste pojedinačno, u kombinaciji sa konvencionalnim antibioticima, mogu ispoljiti sinergistički efekat. Takođe je dokazano da sinergistička aktivnost dobijena primenom nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa redukuje minimalnu efektivnu dozu antibiotika u tretmanu infekcija. Na ovaj način dolazi do redukcije neželjenih efekata konvencionalnih antibiotika (Burt, 2004). Međutim, bitno je istaći da neutralizacija neželjenih efekata konvencionalnih antibiotika pomoćnim prirodnim agensima ne može biti okarakterisana kao pravi sinergizam, ako efikasnost antimikrobnih agenasa u kombinaciji nije poboljšana (Wagner i Ulrich-Merzenich, 2009).

Kao što je ranije istaknuto, antibakterijska aktivnost etarskih ulja i biljnih ekstrakata zavisi od sastava i sadržaja biološki aktivnih komponenti. Rezultati studije u kojoj je vršeno poređenje sinergizma nekoliko biološki aktivnih komponenti etarskih ulja i antibiotika protiv rezistentnih bakterijskih sojeva su pokazali da je sinergizam češće detektovan u kombinacijama sa karvakrolom i timolom, nego sa eugenolom protiv vrsta *Salmonella* Typhimurium, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus* (Palaniappan i Holley, 2010). Ova razlika u aktivnosti može biti posledica postojanja delokalizovanih elektrona u prstenu karvakrola i timola, a koje eugenol ne poseduje u svojoj hemijskoj strukturi. Pretpostavlja se da ovi delokalizovani elektroni učestvuju u pozicioniranju karvakrola i timola u hidrofobnim bakterijskim membranama (Veldhuizen i sar., 2006). Na prvi pogled male razlike u hemijskoj strukturi biološki aktivnih komponenti biljaka mogu značajno uticati na interakcije sa konvencionalnim antibioticima i posledično uticati na sposobnost ostvarivanja sinergističkih efekata. Na primer, karvakrol i timol su strukturno slični, razlikuju se samo u položaju hidroksilne grupe. Međutim, karvakrol u kombinaciji sa ampicilinom i nitrofurantionom je delovao sinergistički, dok su kombinacije timola sa istim antibioticima ispoljile indiferentni efekat na sojeve vrsta *S. paucimobilis* i *K. oxytoca* (Zhang i sar., 2011).

Neki fenilpropanoidi koji su prisutni u hrani poseduju antimikrobne karakteristike, naročito cimetna kiselina i srodna jedinjenja (Hemaiswarya i Doble, 2010). Sinergizam cimetne kiseline protiv Gram negativnih (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*) i Gram pozitivnih (*Staphylococcus aureus*) bakterija je utvrđen u kombinaciji sa amikacinom, ampicilinom, ciprofloksacinom, eritromicinom i vankomicinom (Hemaiswarya i Doble, 2010).

Rezultati ispitivanja *in vivo* sinergizma alternativnih i konvencionalnih antimikobnih agenasa sa ciljem unapređenja efikasnosti antibiotika u antibakterijskoj terapiji, nisu do sada sistematično rađena. Na primer, sprovedena je klinička studija koja je ispitivala efekat smeše etraskih ulja eukaliptusa na tretman nekrotičnih čireva kod pacijenata obolelih od kancera, a kod kojih se primenjuje i antibiotska terapija (Warnke i sar., 2006). Pomenuta smeša etraskih ulja eukaliptusa koja je primenjena na koži pacijenata, sadržala je α -pinen, 1,8-cineol, γ -terpinen i p-cimen (Tyagi i Malik, 2011). Tretman etarskim uljima eukaliptusa doveo je do smanjenja inflamacije i neprijatnih mirisa, a u nekim slučajevima čak i do potpunog povlačenja čireva (Warnke i sar., 2006). Iako je način aplikacije smeše etraskih ulja i antibiotika bio različit, interakcija između ova dva antimikrobna agensa ne može biti zanemarena. Sa više saznanja o sinergističkim interakcijama i njihovom delovanju u živim sistemima bilo bi moguće razviti najpogodnije kombinacije agenasa i smanjiti multiplu rezistenciju bakterija.

2.3.6. AKTIVNOST NEKONVENCIONALNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA NA *A. baumannii*

Antimikrobni efekat etarskih ulja i ekstrakata raličitih delova biljaka su dobro proučeni u velikom broju studija zbog izražene antimikrobnosti, a *A. baumannii* kao jedan od značajnih oportunističkih patogena sa veoma izraženom rezistencijom na konvencionalne antimikrobne agense je poslednjih godina čest predmet ovih istraživanja (tabela 2.3). U velikom broju studija, protiv bakterijske vrste *A. baumannii*, korišćene su različite biljne vrste poznate po svojoj antimikrobnoj aktivnosti, a među njima veoma često biljke iz roda *Eucalyptus*. Etarska ulja i biljni ekstrakti testiranih vrsta su ispoljavala antimikrobnu aktivnost u različitoj meri, pri čemu je antibakterijska aktivnost većine nekonvencionalnih antimikrobni agenasa detektovana pri koncentracijama 1-2 mg mL⁻¹ protiv *A. baumannii* sojeva (tabela 2.5). Ove studije mogu poslužiti kao smernice koje će ukazati na potencijalni pravac daljih istraživanja u cilju prevazilaženja problema rezistencije *A. baumannii* sojeva.

Osim aktivnosti prirodnih nekonvencionalnih antimikrobni agenasa postoje studije u kojima je utvrđena aktivnost bioaktivnih komponenti etarskih ulja i biljnih ekstrakata protiv *A. baumannii*.

Tabela 2.5. Antimikrobana efikasnost nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa protiv *Acinetobacter baumannii*

Tip agensa	Antimikrobni agens	MIC vrednost*	Jedinica	Metoda**	Referenca
Etarško ulje	<i>Syzygium aromaticum</i>	0,125	% (v/v)	ADM	Prakasam i sar., 2014
	<i>Mentha x piperita</i>	0,25			
	<i>Eucalyptus</i> sp.	0,25			
	<i>Foeniculum vulgare</i>	2,0	% (v/v)	MDM	Jazani i sar., 2009
	<i>Artemisia dracuncululus</i>	2,0	% (v/v)	MDM	Jazani i sar., 2011
	<i>Anthemis gayana</i>	10,0	% (v/v)	ADM	Vakili i sar., 2013
	<i>Origanum vulgare</i>	0,125	% (v/v)	MDM	da Costa i sar., 2009
	<i>Origanum vulgare</i>	ref. 200 klin. 100-400	mg L ⁻¹	MDM	Becerril i sar., 2012
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	ref. 200 klin. 200-400			
	<i>Citrus hystrix</i>	1-17,0	mg mL ⁻¹	MDM	Srisukh i sar., 2012
	<i>Eucalyptus globulus</i>	1-2,0	mg mL ⁻¹	MDM	Mulyaningsih i sar., 2010, 2011
	<i>Eucalyptus radiata</i>	1,0			
	<i>Eucalyptus citadora</i>	2,0			
	<i>Rosa damascena</i>	2,0	mg mL ⁻¹		Shohaye i sar., 2014
	<i>Satureja khuzestanica</i>	0,2-0,5	µg mL ⁻¹	DDM	Saghi i sar., 2014
	<i>Thymus</i> sp.	0,3-0,6			
	<i>Aniba rosaedora</i>	0,12	%(v/v)	ADM	Hammer i sar., 1999
	<i>Apium graveolens</i>	>2,0			
	<i>Boswellia carterii</i>	1,0			
	<i>Cananga odorata</i>	1,0			
	<i>Cedrus atlantica</i>	>2,0			
	<i>Citrus aurantifolia</i>	1,0			
	<i>Citrus aurantium</i>	>2,0			
	<i>Citrus aurantium</i>	0,5			
	<i>Citrus aurantium</i> var. <i>bergamia</i>	2,0			
	<i>Citrus limon</i>	>2,0			
	<i>Citrus x paradisi</i>	>2,0			
	<i>Citrus reticulata</i> var. <i>madurensis</i>	>2,0			
	<i>Commiphora myrrha</i>	>2,0			
	<i>Coriandrum sativum</i>	0,25			
	<i>Cucurbita pepo</i>	>2,0			
	<i>Cupressus sempervirens</i>	>2,0			
	<i>Cymbopogon citratus</i>	0,03			
	<i>Cymbopogon martinii</i>	0,12			
<i>Cymbopogon nardus</i>	0,25				
<i>Daucus carota</i>	>2,0				
<i>Eucalyptus polybractea</i>	1,0				
<i>Foeniculum vulgare</i>	1,0				
<i>Gaultheria procumbens</i>	0,25				
<i>Juniperus communis</i>	>2,0				
<i>Lavandula angustifolia</i> (fransuska)	1,0				
<i>Lavandula angustifolia</i> (tasmanijska)	0,5				
<i>Macadamia integrifolia</i>	>2,0				

<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,25			
<i>Melaleuca cajuputi</i>	1,0			
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	0,25			
<i>Mentha x piperita</i>	0,5			
<i>Mentha spicata</i>	0,25			
<i>Ocimum basilicum</i>	0,5			
<i>Oenothera biennis</i>	>2,0			
<i>Origanum majorana</i>	0,25			
<i>Origanum vulgare</i>	0,12			
<i>Pelargonium graveolens</i>	0,25			
<i>Pimpinella anisum</i>	0,5			
<i>Pimenta racemosa</i>	0,12			
<i>Pinus sylvestris</i>	2,0			
<i>Piper nigrum</i>	>2,0			
<i>Pogostemon patchouli</i>	>2,0			
<i>Prunus armeniaca</i>	>2,0			
<i>Prunus dulcis</i>	>2,0			
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,0			
<i>Salvia officinalis</i>	0,5			
<i>Salvia sclarea</i>	>2,0			
<i>Santalum album</i>	>2,0			
<i>Syzygium aromaticum</i>	0,25			
<i>Thymus vulgaris</i>	0,12			
<i>Vetiveria zizanioides</i>	>2,0			
<i>Zingiber officinale</i>	>2,0			
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	NA	mg mL ⁻¹	MDM	Jazani i sar., 2012
<i>Agrimonia pilosa</i>	30,0	mg mL ⁻¹	MDM	Miyasaki i sar., 2010
<i>Caesalpinia sappan</i>	20,0			
<i>Camellia sinensis</i>	11,0			
<i>Cornusoffi cinalis</i>	26,0			
<i>Crataegus cuneata</i>	12,0			
<i>Epimedium brevicornum</i>	16,0			
<i>Ligustrum lucidum</i>	28,0			
<i>Magnolia officinalis</i>	3,8			
<i>Mahonia bealei</i>	12,0			
<i>Paeonia suffruticosa</i>	15,0			
<i>Prunella vulgaris</i>	11,0			
<i>Rabdosia rubescens</i>	4,6			
<i>Rhodiola rosea</i>	67,0			
<i>Rosa rugosa</i>	1,9			
<i>Rubus chingii</i>	6,3			
<i>Scutellaria baicalensis</i>	1,4			
<i>Scutellaria barbata</i>	35,0			
<i>Terminalia chebula</i>	12,0			

* ref.-referentni sojevi, klin.-klinički izolati, NA-rezultati nisu dostupni, **MDM - mikrodilucioni metod, ADM - agar-dilucioni metod, DDM - disk-difuzioni metod

Utvrđeno je da aromadendren, seskviterpenski ugljovodonik koji je zastupljen u etarskom ulju vrsta roda *Eucalyptus*, narušava strukturu ćelijske membrane i uzrokuje nepravilno

uvijanje proteina, a takođe poseduje antibakterijsku aktivnost protiv *A. baumannii* pri MIC vrednostima od 2 mg mL⁻¹ (Rai i Kon, 2013). Takođe, monoterpenoidni ciklični etar, 1,8-cineol, koji je dominantna komponenta etarskih ulja bosiljka, kamfora, korijandera, eukaliptusa i ruzmarina, je protiv vrste *A. baumannii* ispoljio inhibitornu aktivnost u koncentraciji 8 mg mL⁻¹, a utvrđeno je da deluje na povećanje permeabilnosti, na kontrakciju protoplazme i na gubitak citoplazmatskog materijala bakterijskih ćelija (De Sousa i sar., 2012; Rai i Kon, 2013). Bakteriostatska aktivnost protiv *A. baumannii* je utvrđena i za alifatične oksidovane derivate monoterpeneske komponente, citronelol (MIC 0,125-0,25 mg mL⁻¹), kao i citronelal koji je komponenta etarskih ulja eukaliptusa, limuna i limunove trave (MIC 2-4 mg mL⁻¹), pri čemu ove komponente uzrokuju oštećenja ćelijskog zida bakterija, oštećenja ćelijske membrane i oslobađanje ćelijskog sadržaja bakterijske ćelije (Rai i Kon, 2013). Međutim, ovo su samo neke od velikog broja detektovanih različitih bioaktivnih komponenti, pri čemu za komponente poput karvakrola, eugenola, timola, cinamil-aldehida i dr. postoji malo podataka o efektu na multiplo rezistentne sojeve genomske vrste *Acinetobacter baumannii*. U nedavnoj studiji su utvrđene MIC vrednosti komponenti karvakrol (0,31 mg mL⁻¹), eugenol (1,25 mg mL⁻¹) i cinamil-aldehid (0,31 mg mL⁻¹) (Montagu i sar., 2014).

Pregled studija u kojima je ispitivana interakcija prirodnih agenasa i konvencionalnih antibiotika protiv genovrste *A. baumannii* dat je u tabeli 2.6.

Tabela 2.6. *In vitro* efekat prirodnih agenasa i konvencionalnih antibiotika protiv *Acinetobacter baumannii*

Etarsko ulje	Konvencionalni agens	FIC indeks	Sinegizam	Referenca
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	amikacin	0,05	+	Guerra i sar., 2012
	gentamicin	0,50	+	
	imipenem	2,00	-	
	meropenem	1,50	-	
<i>Citrus limon</i>	amikacin	0,04	+	
	gentamicin	0,50	+	
	imipenem	2,00	-	
	meropenem	2,00	-	
<i>Coriandrum sativum</i>	cefoperazon	0,75-1,00	-	Duarte i sar., 2013
	hloramfenikol	0,05-0,31	+	
	ciprofloksacin	0,28-0,38	+	
	gentamicin	0,25-0,38	+	
	pipreacilin	0,63-1,00	-	
	tetraciklin	0,19-0,31	+	
<i>Helichrysum italicum</i>	hloramfenikol	≤0,50	+	Lorenzi i sar., 2009
<i>Origanum vulgare</i>	gentamicin	0,65	-	Rosato i sar., 2010
<i>Melaleuca alternifolia</i>	gentamicin	0,50	+	
<i>Aniba rosaeodora</i>	gentamicin	0,11	+	Rosato i sar., 2007
<i>Pelargonium graveolens</i>	gentamicin	0,11	+	

Sinergističke interakcije etarskih ulja su najčešće detektovane u kombinaciji sa konvencionalnim antibioticima kao što su amikacin, gentamicin, ciprofloksacin i hloramfenikol (LaPlante, 2007; Guerra i sar., 2012; Duarte i sar., 2012), dok su kombinacije sa pojedinim antibioticima (meropenem i imipenem) ispoljile aditivan ili indiferentan efekat (Guerra i sar., 2012). Većina ovih interakcija mogu biti okarakterisane kao umereni sinergizam, što je najverovatnije posledica membranskih interakcija sa bioaktivnim komponentama etarskih ulja i biljnih ekstrakata. Međutim, broj studija u kome su kombinovani alternativni i konvencionalni antibiotici u kontroli *A. baumannii* još uvek je veoma ograničen. Dosadašnja istraživanja ukazuju da nekonvencionalni antimikrobni agensi mogu predstavljati zanimljiv izbor i alternativu za smanjenje upotrebe antibiotika. Korišćenje etarskih ulja u sprečavanju širenja bakterijske rezistencije *A. baumannii* još uvek nije dovoljno proučeno za mnoga ulja i ekstrakte, kao i njihova kombinacija sa konvencionalnim agensima.

3. CILJ RADA

Na osnovu literaturnih podataka jasno je da je problem multiple rezistencije bakterijske vrste *A. baumannii* veliki izazov današnjice i da su neophodna sistematičnija i sveobuhvatnija istraživanja na polju pronalazaženja alternativnih agenasa i strategija za njegovu kontrolu. Iz tog razloga, opšti cilj istraživanja je upravo pronalazaženje novih, nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa i/ili strategija u kontroli multiplo rezistentnih sojeva *Acinetobacter baumannii*. Realizacija opšteg cilja biće ostvarena kroz nekoliko specifičnih ciljeva:

- Formiranje kolekcije multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva iz humanog patološkog materijala i iz prirodne sredine, kao i njihova detaljna karakterizacija primenom različitih mikrobioloških, biohemijskih i molekularno-genetičkih metoda. Ostvarivanjem ovog specifičnog cilja oformljena kolekcija multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva biće korišćena u daljim istraživanjima;
- Ispitivanje uticaja hemijski okarakterisanih etarskih ulja biljaka iz familija Myrtaceae (*Myrtus communis* subsp. *tarentina* i *Eucalyptus camaldulensis*), Cupressaceae (*Juniperus sabina*, *Juniperus sibirica*, *Juniperus ocedrus*, *Juniperus communis*, *Juniperus macrocarpa*, *Juniperus excelsa*, *Juniperus phoenicea* i *Juniperus foetidissima*), Lamiaceae (*Hyssopus officinalis*, *Mentha x piperita*, *Satureja hortensis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Origanum majorana*, *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Ocimum basilicum* i *Rosmarinus officinalis*), Apiaceae (*Foeniculum vulgare*, *Petroselinum crispum* i *Coriandrum sativum*) i Asteraceae (*Artemisia dracuncululus* i *Achillea millefolium*) na *Acinetobacter baumannii* izolate iz humanog patološkog materijala;
- Ispitivanje uticaja hemijski okarakterisanih biljnih ekstrakata biljaka iz familija Polygonaceae (*Rumex crispus* i *Rumex sanguineus*), Urticaceae (*Urtica dioica*) i Alliaceae (*Allium melanantherum*, *Allium fuscum*, *Allium paniculatum* subsp. *marginatum*, *Allium rhodopeum*, *Allium cepa* i *Allium sativum*), takođe na sojeve genovrste *A. baumannii*;
- Bioautografska detekcija grupa jedinjenja sa anti-*A. baumannii* potencijalom;
- Ispitivanje efekta standardnih jedinjenja, tj. odabranih komponenti etarskih ulja (α -pinen, (R)-(+)-limonen, sabinen, 3-karen, α -terpinen, γ -terpinen, terpinolen, (-)-terpinen-4-ol, timol, karvakrol i eugenol) i biljnih ekstrakata (kvercetin, katehin, cimetna kiselina i emodin) na rast *A. baumannii* izolata u tečnoj kulturi;

-
- Utvrđivanje efekta odabranih prirodnih nekonvencionalnih agenasa na slobodno plivajuće (planktonske) bakterije i one koje rastu u formi biofilma, pri čemu će efekat agenasa biti ispitan kako na proces formiranja biofilma, tako i na uklanjanje već formiranog biofilma.
 - Utvrđivanje potencijalnog mehanizma delovanja odabranih nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa na bakterijske ćelije vrste *A. baumannii*, praćenjem oslobađanja proteina, lipida i ugljenih hidrata iz ćelija, promene proteinskog profila tretiranih ćelija i primenom skenirajuće elektronske mikroskopije ćelija tretiranih odabranim alternativnim, prirodnim antimikrobnim agensima;
 - Utvrđivanje adekvatnih kombinacija za eradikaciju multiplo rezistentnih bakterija, kombinovanjem nekonvencionalnih, prirodnih agenasa, ili njihovim kombinovanjem sa konvencionalnim agensima protiv *A. baumannii* sojeva. Specifični cilj će biti ostvaren primenom metoda za ispitivanje sinergističkih interakcija odabranih agenasa;

Ostvarivanjem opšteg cilja ponudiće se potencijalna adekvatna rešenja za prevazilaženje problema multiple rezistencije bakterijske vrste *A. baumannii*, a osim toga dobijeni rezultati će predstavljati osnov i smernice za dalja *in vivo* i klinička istraživanja.

4. MATERIJAL I METODE

U predstojećim poglavljima biće dat pregled korišćenih metoda za formiranje kolekcije kultura *Acinetobacter baumannii* sojeva i njihovu fenotipsku i genotipsku karakterizaciju, a biće opisane i metode za utvrđivanje potencijalnih efekata nekonvencionalnih agenasa koje ostvaruju na sojeve genomske vrste *A. baumannii*, pojedinačno i u kombinaciji sa konvencionalnim antimikrobnim agensima.

4.1. FORMIRANJE KOLEKCIJE KULTURA OKARAKTERISANIH MULTIPLO REZISTENTNIH SOJEVA VRSTE *A. baumannii*

U cilju formiranja detaljno okarakterisane kolekcije kultura vrste *A. baumannii* vršena je izolacija, identifikacija, fenotipska i genotipska karakterizacija izolata.

4.1.1. IZOLACIJA *A. baumannii* SOJEVA

U istraživanju je korišćeno ukupno 31 soj bakterijske vrste *A. baumannii*. Tri soja su bila referentna, pri čemu su dva iz American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) (ATCC 19606 i ATCC BAA 747) i jedan soj NCTC 13423 iz National Collection of Type Cultures (Public Health England, UK), dok su ostali sojevi izolovani iz različitih uzoraka.

Sojevi *A. baumannii* poreklom iz humanog patološkog materijala su dobijeni ljubaznošću Nataše Stanković-Nedeljković sa Odeljenja za higijenu i epidemiologiju Zdravstvenog centra u Aleksincu. Dobijeno je ukupno 20 sojeva vrste *A. baumannii* koji su najpre potvrdno identifikovani sa ostalim izolatima, a potom su korišćeni u daljem radu.

Ostali sojevi su izolovani iz prirodnih sredina, tačnije iz akvatičnih ekosistema. Uzorci su prikupljeni sa 11 lokaliteta (tabela 4.1). Uzorkovanje je vršeno u sterilnim posudama, koji su dopremljeni u laboratoriju i čuvani u frižideru na 4 °C do obrade. Uzorci su analizirani najkasnije 24 h od momenta uzorkovanja. Svi uzorci su prikupljeni u periodu od februara do avgusta 2010. godine.

A. baumannii je izolovan iz prirodnih uzoraka direktno i primenom metode obogaćenja.

Direktno zasejavanje uzoraka vršeno je metodom razmazivanja (*spread plate*) na kombinovanu (selektivnu i diferencijalnu) hranljivu podlogu Herella agar*, pri čemu je zasejano 0,5 mL originalnog uzorka u dva ponavljanja, bez obogaćenja. Petri ploče su inkubirane tokom 48 h na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije vršeno je brojanje žutih i ljubičastih kolonija.

* Tripton 15,00 g L⁻¹, sojaton 5,00 g L⁻¹, natrijum-hlorid 5,00 g L⁻¹, laktoza 10,00 g L⁻¹, maltoza 10,00 g L⁻¹, žučne soli 1,25 g L⁻¹ brom-krezol ljubičasto, 0,02 g L⁻¹, agar 15,00 g L⁻¹, pH 6,8 ± 0,2

Tabela 4.1. Uzorci za izolaciju *A. baumannii* sojeva

Oznaka uzorka	Poreklo uzorka	Lokalitet
SR		Srnjanska reka, Kruševac
ZM		Zapadna Morava, Kruševac
DN		Dunav - pre mesta izliva kanalizacije, Novi Sad
DZ	površinska voda	Dunav – posle mesta izliva kanalizacije, Novi Sad
DP		Veštačka akumulacija Dunavskog Parka, Novi Sad
DTD		Kanal Dunav-Tisa-Dunav, Novi Sad
BJ		Begečka Jama, Begeč
DB		Dunav, Begeč
P1	podzemna voda	Novi Sad
P2		Novi Sad
P3		Novi Sad

Procedura izolacije *Acinetobacter* spp. korišćenjem podloge za obogaćenje je opisana od strane Baumann-a (1968), a podrazumeva upotrebu Baumann-ove podloge za obogaćenje* čije su komponente rastvorene u 0,04M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ puferu (pH 6,0) do zapremine od 1 litra. Za kultivaciju bakterija kompleksa *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* korišćeno je 8 različitih izvora ugljenika, tako što je u Baumann-ovoj podlozi za obogaćenje natrijum acetat zamenjen odgovarajućim alternativnim supstratom: β -alanin, etanol, L-fenilalanin, L-histidin, natrijum-L-laktat, L-leucin, natrijum piruvat i L-tirozin.

Podloga za obogaćenje je pripremljena kao dvostruko-koncentrovana, i u svaku od podloga dodat je uzorak (1:1, v/v) pri čemu je finalna zapremina iznosila 10 mL. Podloge su inkubirane 24 h i 48 h na temperaturi od 37 °C uz agitaciju na 200 rpm na orbitalnom šejkeru (Heidolph UNIMAX 2010, Germany). Nakon isteka perioda inkubacije, vizuelno je utvrđivana pojava zamućenja, a upotrebom kolorimetra (Iskra, Slovenija) izvršena je kvantifikacija zamućenja, očitavanjem vrednosti transmisije podloge. Što su vrednosti transmisije svetlosti bile manje, bakterijski rast je bio veći i obrnuto, pri čemu transmisija od 100 % ukazuje na potpuno odsustvo rasta.

Za izolaciju vrsta *Acinetobacter baumannii* iz obogaćenih uzoraka korišćena je podloga Herella agar. Nakon inkubacije podloga za obogaćenje, nakon 24 h, na petri ploče sa Herella agarom izolirajuće (metodom ispljivanja) je zasejano 10 μL svake podloge za obogaćenje. Ploče su inkubirane 24 h na temperaturi od 37 °C. Postupak je ponovljen i nakon 48 h obogaćenja. Izrasle blede-ljubičaste kolonije presejane su sa Herella agara na Hranljivi agar (Torlak, Srbija) i inkubirane 24 h na temperaturi od 42 °C. Nakon isteka perioda inkubacije utvrđivano je prisustvo rasta.

* Natrijum acetat trihidrat 2,00 g L⁻¹, kalijum nitrat 2,00 g L⁻¹, magnezijum sulfat heptahidrat 0,20 g L⁻¹.

4.1.2. IDENTIFIKACIJA *A. baumannii* SOJEVA

Svi izolati su zasejani izolirajuće na Hranljivi agar (Torlak, Srbija), inkubirani na 42 °C preko noći, a potom je vršena morfološka, fitiološka i biohemijska karakterizacija sojeva. Morfološke osobine su utvrđene bojenjem izolata po Gramu, od fizioloških karakteristika ispitivan je rast na 4 °C i 44 °C, dok su biohemijska svojstva utvrđena primenom različitih biohemijskih testova koji su zbog efikasnosti identifikacije podeljeni na preliminarnu testove i testove za potvrdnu identifikaciju.

Za preliminarnu identifikaciju korišćeni su sledeći testovi: katalaza test, oksidaza test, oksidativno-fermentativni test (O/F test) i test za dokazivanje denitrifikacije. O/F podloga i podloga za dokazivanje denitrifikacije se nakon zasejavanja inkubiraju 24 h na temperaturi od 37 °C, nakon čega se očitavaju rezultati.

Katalaza test, kojim se dokazuje prisustvo enzima katalaze, izveden je upotrebom vodonik peroksida (H₂O₂). Test je vršen nakon rasta bakterije na Hranljivom agaru (Torlak, Srbija). Na površinu bakterijskog rasta dodata je po jedna kap 3 % H₂O₂. Nakon nekoliko sekundi, u slučaju prisustva enzima katalaze, koja trenutno razgrađuje vodonik peroksid na molekularni kiseonik (O₂) i vodu, dolazi do pojave mehurića i pene. Ovaj test je za pripadnike kompleksa *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* pozitivan (Brown, 2007).

Oksidaza testom je utvrđeno prisustvo enzima citohrom c oksidaze, koji je poslednji enzim u nizu u transportu elektrona u respiratornom lancu i koji oksiduje citohrom c, a redukuje kiseonik. Oksidaza test je vršen upotrebom oksidaza reagensa*. Preko kolonije izrasle na čvrstoj podlozi, stavljen je komad filter papira i prelišen oksidaza reagensom. Reagens je u redukovanom stanju bezbojan, a u oksidovanom ljubičast. Odsustvo promene boje reagensa ukazuje da izolat nema citohrom c oksidazu, što je slučaj sa pripadnicima kompleksa *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, dok se u suprotnom, kod pozitivne reakcije, boja menja u ljubičastu u roku od 10 do 30 sekundi. Ovaj test je važan za razlikovanje vrsta roda *Acinetobacter* od bakterija koje pripadaju rodovima *Neisseria* i *Moraxella*, a koje su oksidaza pozitivne (Petrović i sar., 1998).

Oksidativno-fermentativni test (O/F test) vršen je upotrebom podloge za oksidaciju i fermentaciju koja sadrži glukozu kao supstrat za oksidaciju i/ili fermentaciju i indikator brom-timol plavo**. Za test su korišćene dve epruvete sa polutečnom podlogom zasejane ubodom, od kojih je jedna zalivena sterilnim parafinskim uljem, čime se onemogućava prodor kiseonika u podlogu, što obezbeđuje uslove za fermentaciju. Bakterije koje vrše oksidaciju glukoze dovode do pojave žute boje u epruveti nezalivenoj mineralnim uljem, a bakterije koje vrše fermentaciju glukoze prisutne u podlozi promeniće boju podloge u žutu u epruveti zalivenoj mineralnim uljem. Bakterije koje imaju sposobnost i oksidacije i

* Komplexon III 1,00 g L⁻¹, natrijum tiosulfat 0,50 g L⁻¹, tetrametil-p-fenildiamin-hidrohlodid 2,00 g L⁻¹.

** Tripton 2,00 g L⁻¹, natrijum hlorid 5,00 g L⁻¹, glukozu 10,00 g L⁻¹, brom timol plavo 0,03 g L⁻¹, kalijum hidrogen fosfat 0,30 g L⁻¹, agar 3,00 g L⁻¹.

fermentacije glukoze menjanju boju podloge u žuto u obe epruvete usled stvaranja organskih kiselina i smanjenja pH vrednosti. Budući da *Acinetobacter baumannii* poseduje isključivo aerobni tip metabolizma, podloga će promeniti boju u žuto samo u epruveti nezalivenoj parafinskim uljem. Ovaj test omogućava razlikovanje *A. baumannii* od bakterija familije Enterobacteriaceae, ali i veoma značajnu diferencijaciju ove vrste od vrsta *Acinetobacter lwoffii* i *Acinetobacter venetianus* koje ne poseduju sposobnost oksidacije (Brenner i sar., 2005). Pošto je podloga polutečna, test ukazuje i na sposobnost kretanja bakterije kroz medijum pomoću flagela, što se očitava pojavom difuznog zamućenja oko mesta uboda. U slučaju *A. baumannii* ovo zamućenje izostaje, jer bakterija ne poseduje flagele.

Test za dokazivanje denitrifikacije vrši se upotrebom podloge ze denitrifikatore (Torlak, Srbija) u koju se nakon inkubacije dodaje reagens za denitrifikatore*, a zatim razređena sumporna kiselina u odnosu 3:1 (v/v) (1 deo koncentrovane kiseline se rastvori u 3 dela dH₂O). U slučaju da bakterijska vrsta vrši denitrifikaciju, nakon dodavanja sumporne kiseline javlja se plavo-crna boja. Vrste roda *Acinetobacter* ne vrše denitrifikaciju i u slučaju njihovog prisustva u podlozi, ne dolazi do promene boje. Ovaj test se takođe korsiti za razlikovanje bakterija roda *Acinetobacter* od bakterija familije Enterobacteriaceae.

Izolati koji su u preliminarnim testovima dali rezultate očekivane za pripadnike kompleksa *A. baumannii* identifikovani su dodatnim testovima, tj. potvrdnim testovima: test produkcije indola, hidrolize želatina, test usvajanja citrata, rast na Endo agaru i MacConkey agaru. Inkubacija inokulisanih podloga vršena je 24 h na temperaturi od 37 °C, nakon čega su očitavani rezultati.

Test produkcije indola je izveden upotrebom podloge Triptozni bujon (Torlak, Srbija). Kulture su zasejane, a nakon isteka perioda inkubacije dodato je nekoliko kapi Kovach-evog reagensa**. U slučaju produkcije indola iz aminokiseline triptofana, na dodirnoj površini hranljivog bujona i reagensa, pojavljuje se crveni prsten. *Acinetobacter baumannii* ne produkuje indol, što se manifestuje odsustvom crvenog prstena. Ovaj test omogućava razlikovanje *A. baumannii* od rodova *Escherichia* i *Edwardsiella*, kao i od nekih indol pozitivnih Gram negativnih nefermentišućih štapića (npr. *Chryseobacterium meningosepticum*).

Test likvefakcije želatina vršen je na podlozi sa 12 % želatina, razlivenoj u epruvete, sterilisanoj u autoklavu i ohlađenoj u uspravnom položaju. Podloge su zasejavane ubodom i inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon isteka perioda inkubacije epruvete su ohlađene u frižideru (4 °C), nakon čega su očitavani rezultati. U slučaju da je želatin i posle hlađenja ostao tečan test je smatran pozitivnim (Brown, 2007). U slučaju bakterija kompleksa *Acinetobacter*

* U 100 mL 20 % proključalog ZnCl₂ dodati smešu napravljenu od 4 g skroba u 150 mL vode. Nakon rastvaranja u ovako pripremljenu smešu dodati 2 g ZnI₂ ili KI. Smešu dopuniti vodom do 1 litre, profiltrirati i držati na tamnom mestu.

** Rasvoriti 3 g dimetilaminobenzaldehid u 75 mL butanola na 50-55 °C, ohladiti i dodati 25 mL koncentrovane HCl. Reagens čuvati u tamnoj boci na 4 °C.

calcoaceticus-baumannii reakcija je negativna, što omogućava njihovu diferencijaciju od *P. aeruginosa*, ali i od nekih genomskih vrsta roda *Acinetobacter* (*A. hemolyticus* – genomski vrsta 4, genomske vrste 6, 13BJ-14TU, 14BJ, 15BJ, 16BJ i 17BJ) (Brenner i sar., 2005).

Za test usvajanja citrata korišćen je Simons citratni agar (Torlak, Srbija) koji je razliven u epruvete, sterilisan u autoklavu i ohlađen u kosom položaju. Bakterijska kultura je zasejavana ubodom i cik-cak potezom po kosoj površini podloge. Usled promene pH vrednosti, tj. usled alkalizacije podloge u slučaju sposobnosti bakterije da koristi citrat kao jedini izvor ugljenika, dolazi do promene boje indikatora iz zelene u plavu. *Acinetobacter baumannii* daje pozitivan test na usvajanje citrata (Brown, 2007), za razliku od *E. coli*, ali i vrsta *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter radioresistens* i *Acinetobacter parvus* (Brenner i sar., 2005).

Rast na Endo agaru (Torlak, Srbija) i MacConkey agaru (Torlak, Srbija) dokazuju da izolati pripadaju kompleksu *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*. Prema Brenner i sar. (2005) vrste ovog kompleksa dobro rastu na većini kompleksnih podloga. Podloga Endo agar omogućava razlikovanje bakterija Acb kompleksa od *Escherichia*, *Enterobacter* i *Klebsiella*. Rast na podlozi MacConkey omogućava diferencijaciju od laktoza fermentišućih Gram negativnih štapića, ali i od nekih Gram negativnih nefermentišućih štapića (npr. *Chryseobacterium*, *Moraxella* i *Eikenella*) koji ne rastu na ovoj podlozi (Brenner i sar., 2005).

Dalja identifikacija vršena je primenom VITEK2 sistema (Tehnološki fakultet, UNS) i/ili primenom molekularno-genetičkih metoda. Sojevi poreklom iz prirodne sredine korišćeni za identifikaciju molekularno-genetičkim metodama su odabrani na osnovu kriterijuma pripadnosti različitim uzorcima, tako da je iz svakog uzorka odabran jedan soj izolovan na podlozi sa Na-acetatom kao supstratom, osim za uzorak SR iz kog je odabrano dva soja, koji su korišćeni kao kontrola za RAPD-PCR analizu. U slučaju izostanka izolacije sojeva na ovoj podlozi, za identifikaciju su korišćeni izolati sa supstrata na kojima je izolacija sojeva od interesa bila uspešna.

Izolacija bakterijske DNK je vršena upotrebom komercijalnog kita GeneJET Genomic DNA Purification Columns prema protokolu za izolaciju genomske DNK Gram negativnih bakterija (Thermo Scientific, Pittsburgh, US). Za identifikaciju sojeva do nivoa genovrste korišćena su dva para prajmera (tabela 4.2). Prvi par prajmera, P-rA1 i P-rA2 korišćen je kao kontrola i kodira visoko konzervisan region *recA* gena roda *Acinetobacter* spp. Produkt ovog para prajmera je veličine 425 bp. Drugi par prajmera, P-Ab-ITSF i P-Ab-ITSB, su specifični prajmeri za amplifikaciju produkta od 208 bp, a koji se vezuju u okviru specifičnog regiona *ITS* gena *A. baumannii* (Chen i sar., 2007).

PCR reakcija je rađena kao multipleks, u 20 µL ukupne zapremine reakcione smeše, koja sadrži 100 ng svakog prajmera, 1 U Green Taq DNK polimeraze, 200 µM dNTP, i 65-550 ng bakterijske DNK u puferu (Green buffer, ThermoScientific).

Tabela 4.2. Oligonukleotidne sekvence za identifikaciju *A. baumannii* izolata

Prajmer	Nukleotidna sekvenca (5' → 3')	Veličina PCR produkta (bp)	Referenca
P-Ab-ITSF	CATTATCACGGTAATTAGTG	208	Chen i sar. 2007
P-Ab-ITSR	AGAGCACTGTGCACTTAAG		
P-rA1	CCTGAATCTTCTGGTAAAAC		
P-rA2	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC		

Uslovi u kojima je izvođena PCR amplifikacija odabranih gena je podrazumevala najpre inicijalnu denaturaciju na 94 °C 5 minuta, praćenu sa 30 reakcionih ciklusa (denaturacija na 94 °C 30 sekundi, vezivanje prajmera na 55 °C 30 sekundi, ekstenzija na 72 °C 30 sekundi), i finalnom ekstenzijom na 72 °C 7 minuta (Chen i sar., 2007). Amplifikovani fragmenti su detektovani i analizirani na 2 % (w/v) agaroznom gelu. Vizuelizacija i fotografisanje gelova je vršeno u transiluminatoru BioDocAnalyze (Biometra, Germany) opremljenom digitalnom kamerom (Cannon EOS 100D).

4.1.3. FENOTIPIZACIJA *A. baumannii* SOJEVA

Izolovani i identifikovani sojevi genomske vrste *Acinetobacter baumannii* su potom detaljno okarakterisani različitim mikrobiološkim metodama.

4.1.3.1. OSETLJIVOST IZOLATA NA KONVENCIONALNE ANTIMIKROBNE AGENSE

Za utvrđivanje rezistencije *A. baumannii* na različite antimikrobne agense primenjene su komercijalno dostupne antimikrobne supstance relevantne za *A. baumannii*: β-laktami (cefalosporini širokog spektra i karbapenemi), aminoglikozidi, fluorohinoloni, lipopeptidi (polimiksini), tetraciklini i fenikoli, ali i inhibitori folatnog puta. U svrhu eksperimenta korišćeni su ceftriakson, kao predstavnik cefalosporina treće generacije; imipenem kao predstavnik klase karbapenema; gentamicin, kanamicin, amikacin, netilmicin i tobramicin iz klase aminoglikozida; ciprofloksacin, kao predstavnik fluorohinolona; polimiksin B iz klase lipopeptida, kao i teraciklin i hloramfenikol iz klasa tetraciklina, odnosno fenikola. Od antibiotika inhibitora folatnog puta korišćena je standardna kombinacija trimetoprima i sulfametoksazola. Korišćen je rastvor antibiotika (ceftriakson, gentamicin, kanamicin, amikacin, ciprofloksacin, polimiksin B, teraciklin i hloramfenikol) u koncentraciji 1024 mg L⁻¹ od kojeg su pravljeni dvostruka razređenja, dok su ostali antibiotici (imipenem, netilmicin, tobramicin i trimetoprim/sulfametoksazol) korišćeni u formi antibiogram diskova.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) konvencionalnih antibiotika je određivana primenom modifikovane mikrodilucione metode (NCCLS, 2003; CLSI, 2007). Pripremljene bakterijske suspenzije gustine 0,5 McFarland (2×10⁸ CFU mL⁻¹) su razređene u tačnoj

dvostruko koncentrovanoj podlozi Mueller Hinton bujon (HiMedia, Indija) u odnosu 1:100 (v/v). Ovako inokulisana podloga dodata je u bunarčice mikrotitar ploče u zapremini od 100 μL . Isti volumen dvostrukih razređenja antibiotika dodat je u bunarčice mikrotitar ploče, pri čemu se finalna koncentracija svakog antibiotika u mikrotitar pločama kretala od 0,125 do 512 mg L^{-1} , osim za polimiksin B, čija se koncentracija kretala u opsegu do 0,031 do 32 mg L^{-1} . Brojnost bakterija u svakom bunarčiću mikrotitar ploče iznosila je oko 1×10^6 CFU mL^{-1} . Mikrotitar ploče su inkubirane tokom 18 h na 37 °C, nakon čega je u svaki bunarčić ploče dodato 10 μL 1 % rastvora 2,3,5-trifenil tetrazolium hlorida (TTC-a), koji se dehidrogenazama vijabilnih bakterijskih ćelija redukuje do formazana crvene boje. Mikrotitar ploče su dodatno inkubirane 2 h na 37 °C, nakon čega je očitana MIC vrednost za svaki antibiotik. Najmanja koncentracija antibiotika potrebna da spreči pojavu crvene boje formazana smatrana je MIC vrednošću. Referentni sojevi *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 korišćeni su za kontrolu primenjene metode. Eksperiment je rađen u najmanje tri nezavisna ponavljanja. Dobijeni rezultati su predstavljeni tabelarno kao vrednosti geometrijske sredine. *A. baumannii* je okarakterisan kao osetljiv, umereno osetljiv ili rezistentan na testirane konvencionalne antibiotike prema preporučenim kriterijumima (NCCLS, 2003; CLSI, 2007).

Vrednost minimalne inhibitorne koncentracije *A. baumannii* izolata iz rana za imipenem (10 μg), netilmicin (30 μg), tobramicin (10 μg), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 μg), ofloksacin (10 μg) i piperacilin (100 μg) (Bioanalyse Ltd., Turkey) je određena standardnom disk-difuzionom metodom (NCCLS, 2003; CLSI, 2007), jer su ovi antimikrobni agensi bili dostupni samo u formi antibiogram diskova. Testirani sojevi su okarakterisani kao osetljiv, umereno osetljiv ili rezistentan na testirane konvencionalne antimikrobne agense prema preporučenim standardnim kriterijumima (CLSI, 2007). *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 su korišćeni za kontrolu primenjene metode.

Vrednost minimalne baktericidne koncentracije (MBC) je određena tako što je iz bunarčića mikrotitar ploče u kojima je određivana MIC i u kojima je došlo do inhibicije bakterijskog rasta, zasejano 10 μL suspenzije na podlogu Mueller Hinton agar (HiMedia, Indija) metodom razmazivanja (eng. *spread plate*). Ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije očitavano je prisustvo, odnosno odsustvo rasta, gde je najmanja koncentracija pri kojoj je došlo do redukcije broja ćelija za $\geq 99,9$ % u odnosu na početnu brojnost smatrana MBC vrednošću. Test je takođe rađen u najmanje tri nezavisna ponavljanja, a rezultati su na isti način izračunati i predstavljeni tabelarno sa rezultatima dobijenih MIC vrednosti.

4.1.3.2. RAST NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJENIKA

Rast tri soja *A. baumannii* na devet različitih izvora ugljenika praćen je primenom Baumann-ove podloge kao baze. Od izvora ugljenika korišćeni su: Na-acetat, β -alanin, etanol, L-fenilalanin, L-histidin, Na-L-laktat, L-leucin, Na-piruvat i L-tirozin, u cilju određivanja najoptimalnijeg izvora ugljenika za rast ove vrste. Ispitivan je rast tri soja, od čega dva referentna (ATCC 19606 i ATCC BAA747) i jednog poreklom iz prirodne sredine (Aba-DN-Ace).

Eksperiment je izveden tako što su najpre od prekonoćnih bakterijskih kultura napravljene suspenzije optičke gustine 0,5 McFarland (2×10^8 CFU mL⁻¹) u 0,9 % fiziološkom rastvoru za sva tri soja. Potom su od suspenzija napravljena decimalna razređenja, tako da je krajnja brojnost bakterijskih ćelija iznosila oko 2×10^3 CFU mL⁻¹. Nakon toga je svaka bakterijska suspenzija dodata u dvostruko koncentrovane podloge za obogaćenje (1:1, v/v), tako da je zapremina finalne suspenzije bila 10 mL, a finalna brojnost je iznosila $\sim 1 \times 10^3$ CFU mL⁻¹. Ovako inokulisane podloge inkubirane u termostatu na 37 °C, a rast je praćen merenjem optičke gustine (OD₆₂₀), nakon 3, 6, 12, 24, 36 i 48 h inkubacije. Eksperiment je rađen u tri nezavisna ponavljanja. Dobijene vrednosti absorbance su izražene kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom i predstavljene grafički pomoću softvera Origin 6.0. (Microcal Software, USA).

4.1.3.3. ANALIZA FENOTIPSKIH KARAKTERISTIKA VAŽNIH ZA PROCES FORMIRANJA BIOFILMA

Ispitivanje fenotipskih karakteristika odgovornih za proces formiranja biofilma je veoma bitno s obzirom da fenotip biofilma ima značajan uticaj na smanjenje osetljivosti bakterija na antimikrobne agense. Testirane su sledeće osobine *A. baumannii* izolata: sposobnost autoagregacije, stepen hidrofobnosti, trzajuća pokretljivost, kao i sposobnost produkcije lektina i njihova semikvantifikacija. Takođe, utvrđen je potencijal adhezije multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata za polistiren.

Test autoagregacije (Basson i sar., 2007) korišćen je kao pokazatelj potencijala ćelija različitih *A. baumannii* sojeva da se međusobno povezuju i formiraju grupacije, tj. autoaglutinate.

Pripremljene su suspenzije bakterija tako što su prekonoćne kulture bakterija isprane i resuspendovane u destilovanoj vodi. Ćelije su isprane dva do tri puta u cilju što boljeg uklanjanja ostataka podloge i ćelijskih produkata. Ovako isprane ćelije su korišćene za pripremu dve serije ćelijskih suspenzija (brojnost bakterijskih ćelija $\sim 1 \times 10^8$ CFU mL⁻¹). Prva serija kiveta nije tretirana, jer je služila za poređenje sa drugom serijom i zato je odmah alikvotirana u mikrotitar ploču i očitana je njena optička gustina. Druga serija kiveta je tretirana tako što je inkubirana 1 h na 37 °C. Nakon inkubacije druga serija kiveta

centrifugirana je dva minuta na 650×g u cilju taloženja formiranih ćelijskih agregata. Obe serije su alikvotirane u mikrotitar ploču u tri ponavljanja. Optička gustina je očitavana na aparatu MultiscanGo (Thermo Scinetific, Finland) na 650 nm i određen je stepen autoagregacije. Stepem autoagregacije svih ispitivanih izolata je određivan upotrebom sledeće jednačine:

$$\% \text{ Autoagregacije} = [(OD_0 - OD_{60}) / OD_0] \times 100,$$

pri čemu se OD_0 odnosi na optičku gustinu netretirane serije, dok OD_{60} podrazumeva optičku gustinu tretirane serije. Test je rađen u tri nezavisna ponavljanja, a srednje vrednosti dobijenih rezultata sa standardnom devijacijom su predstavljene grafički primenom softvera Origin 6.0. (Microcal Software, USA). Bakterijski izolati kod kojih je stepen autoagregacije bio >50 % smatrani su izrazito agregativni, umereno agregativni izolati su imali stepen agregacije 20-50 %, dok su izolati kod kojih je stepen autoagregacije bio <20 % smatrani neagregativnim (Malik i sar., 2003).

Za određivanje hidrofobnosti *A. baumannii* izolata korišćen je test adhezije bakterija za ugljovodonike (eng. *Bacterial adherence to hydrocarbons* - BATH) (Mattos-Guaraldi i sar., 1999). Suspenzije ćelija su pripremane tako što su prekonocne kulture dva puta isprane u dikalijum puferu*. Pripremane su dve serije suspenzija bakterija (tretirana i netretirana serija) u dikalijum puferu, tako da brojnost bakterija bude oko 2×10^8 CFU mL⁻¹. Nakon toga, 200 μl suspenzije kontrolne serije je alikvotirano u mikrotitar ploču u tri ponavljanja, dok je u drugu seriju dodat ugljovodonik n-heksadekan u odnosu 1:10 (v/v). Epruvete sa ugljovodnikom su u digestoru vorteksirane dva minuta, a potom ostavljene petnaest minuta na sobnoj temperaturi da bi se vodena i ugljovodonična faza razdvojile. Vodena faza preneti je u nove epruvete i ostavljena u frižideru preko noći da ugljovodonik ispari, da ne bi doveo do oštećenja polistirenske mikrotitar ploče i pogrešnog očitavanja rezultata. Sadržaj epruveta je alikvotiran u triplikatu u mikrotitar ploču i optička gustina je očitavana na MultiscanGo (Thermo Scinetific, Finland) na 560 nm (A_1). Vrednosti rezultata su izražene kao procenat ćelija koje adheriraju za n-heksadekan (A) u odnosu na kontrolnu suspenziju (A_0):

$$A = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

Test je rađen u tri nezavisna ponavljanja, pri čemu su srednje vrednosti dobijenih procenata sa standardnom devijacijom predstavljene grafički primenom softvera Origin 6.0. (Microcal Software, USA). Rezultati su tumačeni tako da su sojevi čije su vrednosti bile >50 % smatrani izrazito hidrofobnim, umereno hidrofobnim kada su vrednosti bile u opsegu 20-50 % i hidrofobnim kada su dobijene vrednosti iznosile <20 % (Mattos-Guaraldi i sar., 1999).

Za ispitivanje trzajućeg kretanja (pokretljivosti pomoću pila tipa IV) *A. baumannii* izolata korišćena je LBA podloga sa 1,5 % agara, koja je nakon sterilizacije razlivana u petri ploče, tako da podloga bude iste debljine. Podloga je inokulisana metodom uboda u centar

* Kalijum hidrogenfosfat trihidrat 22,20 g L⁻¹, kalijum dihidrogenfosfat 7,26 g L⁻¹, urea 1,80 g L⁻¹, magnezijum sulfat heptahidrat 0,20 g L⁻¹; pH 7,1.

ploče sterilnom ezom, a ispitivan je samo po jedan soj u petri ploči, u cilju izbegavanja preklapanja zona pokretljivosti različitih sojeva. Ploče su inkubirane na 37 °C, a zone difuznog zamućenja na dodiru podloge i dna staklene petrijeve ploče su merene nakon 48 h (Rashid i Kornberg, 2000). U slučaju da su zone imale nepravilan oblik, merena su tri prečnika i računata je srednja vrednost. Ovaj test je rađen u tri nezavisna ponavljanja, a rezultati su predstavljeni tabelarno, kao vrednost aritmetičke sredine sva tri ponavljanja sa standardnom devijacijom.

Radi utvrđivanja sposobnosti produkcije lektina, kao i što bolje karakterizacije lektina produkovanih od strane *A. baumannii* izolata testirana je specifičnosti bakterijskih lektina prema različitim krvnim gupama. U ovu svrhu korišćene su tri krvne grupe O Rh+, A Rh+ i B Rh+, pri čemu je test rađen upotrebom 3 % ratvora humanih eritrocita*.

Prekonoćne baterijske kulture su centrifugirane na 6000×g u toku 40 minuta na 4 °C. Dobijeni supernatant je testiran na prisustvo lektina. U mikrotitar ploču sa U dnom je dotat supernatant svakog od ispitivanih *A. baumannii* izolata i 3 % rastvor humanih eritorcita (1:1, v/v) (Patil i sar., 2001). Kao negativna kontrola korišćen je 0,9 % fiziološki rastvor sa 3 % rastvorom humanih eritrocita u istom odnosu. Eksperiment je rađen na isti način za svaku od ispitivanih krvnih grupa, a prisustvo lektina se uočava kao crveni talog na dnu bunarčića mikrotitar ploče.

Određivanje titra produkcije lektina je vršeno modifikovanom *ex vivo* semikvantitativnom metodom primenom testa hemaglutinacije (Patil i sar., 2001). Supenzije *A. baumannii* izolata (2×10^8 CFU mL⁻¹) su zasejane u Mueller Hinton bujon, tako da je početna brojnost bakterijskih ćelija iznosila 10^7 CFU mL⁻¹. Ovako inokulisana podloga je inkubirana u toku 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, bakterijska suspenzija je centrifugirana na 6000×g u toku 40 minuta na 4 °C. Supernatant je testiran na prisustvo lektina.

Za *ex vivo* test hemaglutinacije korišćen je 3 % rastvor eritrocita A Rh+ grupe. U mikrotitar pločama sa U dnom napravljena su dvostruka razređenja supernatanta centrifugiranih bakterijskih suspenzija, koji je u finalnoj zapremini bio dvostruko razređen od 2 do 2048 puta. U sve bunarčiće mikrotitar ploče sa supernatantom je potom dodat sterilan fiziološki rastvor i 3 % rastvor eritrocita (2:1:1, v/v/v). Ploče su potom kružnim pokretima mešane u toku 5 minuta. Fiziološki rastvor i neinokulisana podloga su korišćeni kao negativne kontrole. Takođe, referentni soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 je korišćen kao pozitivna kontrola. Aglutinacija eritrocita je praćena u narednih 30 minuta do 1 h. Vrednost najvećeg razređenja supernatanta koja je dovela do hemaglutinacije i dala pozitivnu reakciju smatrana je titrom lektina. Bunarčići mikrotitar ploče u kojima je došlo do hemaglutinacije sa bilo kojim razblaženjem supernatanta su zabeleženi kao pozitivni na prisustvo lektina. Test je

* Krv je izvađena u 1,00 % EDTA, tri puta isprana u 0,90 % fiziološkom rastvoru (centrifugiranjem 5 minuta na 800×g) i dodata u konzervans za eritrocite Alserver (glukoza 113,79 mM, natrijum citrat 31,00 mM, natrijum hlorid 71,87 mM, limunska kiselina 2,86 mM, rastvor je pripremljen u dejonizovanoj vodi) u odnosu 1:2 (v/v).

rađen u tri nezavisna ponavljanja, a dobijeni rezultati su predstavljeni tabelarno kao modus vrednost sva tri ponavljanja.

Kvantifikacija formiranog biofilma od strane *A. baumannii* izolata izvršena je modifikovanom metodom u mikrotitar pločama koja se standardno koristi za procenu potencijala bakterija da formiraju biofilm (Knezevic i Petrovic, 2008b). Test određivanja potencijala formiranja biofilma je rađen sa *A. baumannii* kulturama starim 24 h. Čelije su prvo isprane i resuspendovane u sterilnoj destilovanoj vodi. Ovako pripremljene kulture su korišćene za pravljenje suspenzije zamućenja 0,5 na skali Mc Farland-a u 0,9 % fiziološkom rastvoru, tako da je brojnost ćelija iznosila oko 2×10^8 CFU mL⁻¹. Ove suspenzije su potom upotrebljene za pravljenje radnih suspenzija bakterija u cilju postizanja odgovarajuće brojnosti ćelija. Suspenzije su razblažene u odnosu 1:100 (v/v) (oko 2×10^6 CFU mL⁻¹) i služile su za inokulaciju LBB podloge (1:10, v/v). Brojnost ćelija u inokulisanim podlogama je iznosila 2×10^5 CFU mL⁻¹ i potom je alikvotirana u mikrotitar ploču u tri ponavljanja po 200 µL. Negativna kontrola je takođe rađena u triplikatu i sadržala je neinokulisanu LBB podlogu i dH₂O. Mikrotitar ploča je inkubirana 24 h na 37 °C.

Nakon isteka perioda inkubacije, podloga iz ploče je odlivena i bunarčići mikrotitar ploče su isprani dva puta fosfatnim puferom (PBS)*, tako što je u svaki bunarčić dodato po 250 µL PBS pufera. Nakon ispiranja i sušenja formirani biofilm je fiksiran 15 minuta na sobnoj temperaturi metanolom. Metanol je potom aspiriran, ploča je osušena, a zatim bojena sa 0,4 % kristal violeta tokom petnaest minuta. Po isteku vremena mikrotitar ploča je isprana pod mlazom vodovodske vode i ostavljena na sušenje. Boja vezana za adherirane ćelije je rastvorena u 250 µL 33 % sirćetne kiseline, a nakon 20 minuta rastvaranja boje, optička gustina je merena na 595 nm na čitaču mikrotitar ploča MultiscanGo (Thermo Scintific, Finland). Test je izveden u tri nezavisna ponavljanja, a dobijeni rezultati su predstavljeni grafički kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom primenom softvera Origin 6.0. (Microcal Software, USA).

Ocena adhezije ćelija vršena je preko OD_c vrednosti, koja predstavlja srednju vrednost optičke gustine negativne kontrole (OD) za testiranu mikrotitar ploču uvećanu za tri standardne devijacije dobijenih za negativne kontrole. Izolati su klasifikovani prema sledećem kriterijumu:

- $OD \leq OD_c =$ neadherentan,
- $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c) =$ slabo adherentan,
- $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c) =$ umereno adherentan,
- $(4 \times OD_c) < OD =$ veoma adherentan (Stepanović i sar., 2000).

* Natrijum hlorid 80,00 g L⁻¹, kalijum hlorid 2,00 g L⁻¹, natrijum hidrogenfosfat 14,40 g L⁻¹, kalijum dihidrogenfosfat 2,40 g L⁻¹, pH 7,4.

4.1.4. GENOTIPIZACIJA *A. baumannii* SOJEVA

Genotipizacija *Acinetobacter baumannii* izolata je vršena u cilju detekcije gena koji se smatraju važnim za virulenciju sojeva i/ili potencijal formiranja biofilma. Vršena je detekcija gena za BAP (eng. *Biofilm Associated Protein*), gena za PER-1 tip β -laktamaza, kao i gena za integrazu klase 1 i 2. Pored toga, vršen je i *in silico* PCR sa prajmerima upotrebom 30 kompletno sekvenciranih genoma *A. baumannii* i ispitana je genetička srodnost ispitivanih izolata primenom RAPD-PCR metode.

4.1.4.1. DETEKCIJA *bap*, *bla_{PER-1}*, *intI1* i *intI2* GENA

Oligonukleotidne sekvence prajmera specifičnih za svaki gen su date u tabeli 4.3. PCR amplifikacija fragmenta svakog pojedinačnog gena je vršena u 20 μ L ukupne zapremine reakcione smeše, koja sadrži 100 ng svakog prajmera, 1 U Green Taq polimeraze, 200 μ M dNTPs i 65-550 ng bakterijske DNK u puferu (Green buffer, Thermoscientific). Uslovi izvođenja PCR amplifikacije odabranih gena su bili drugačiji u zavisnosti od odabranog gena.

Tabela 4.3. Oligonukleotidne sekvence za PCR analizu *A. baumannii* izolata

Prajmer	Nukletotidna sekvenca (5' \rightarrow 3')	Veličina PCR produkta (bp)	Referenca
Aba_bap-F	TGCTGACAGTGACGTAGAACCACA	823	Brossard i
Aba_bap-R	TGCAACTAGTGGAATAGCAGCCCA		Campagnari, 2011
Aba_bla _{PER-1} -F	ATGAATGTCATTATAAAAGC	925	Poirel i sar. 1999
Aba_bla _{PER-1} -R	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA		
Aba_Int1-F	CAGTGGACATAAGCCTGTTC	160	Koeleman i sar. 2001
Aba_Int1-R	CCCGAGGCATAGACTGTA		
Aba_Int2-F	TTGCGAGTATCCATAACCTG	288	
Aba_Int2-R	TTACCTGCACTGGATTAAGC		

PCR amplifikacija *bap* gena podrazumeva inicijalnu denaturaciju na 94 °C 5 minuta, praćenu sa 30 reakcionih ciklusa (denaturacija na 94 °C 30 sekundi, vezivanje prajmera na 55 °C 30 sekundi, ekstenzija na 72 °C 30 sekundi), i finalnom ekstenzijom na 72 °C 7 minuta (Brossard i Campagnari, 2011). Veličina produkata PCR amplifikacije ovog gena primenom navedenih prajmera iznosi 184 bp.

Uslovi PCR amplifikacije *bla_{PER-1}* gena uključuju inicijalnu denaturaciju na 94 °C 5 minuta, nakon koje sledi 30 reakcionih ciklusa (30 sekundi denaturacije na 94 °C, zatim 30 sekundi anilinga prajmera na 45 °C, i 30 sekundi ekstenzije na 72 °C), sa finalnom ekstenzijom na 72 °C u toku 7 minuta (Poirel i sar., 1999), a veličina produkata PCR amplifikacije iznosi 925 bp.

Multipleks PCR amplifikacija gena za integrazu tipa 1 i 2 takođe uključuje inicijalnu denaturaciju na 94 °C 5 minuta, nakon koje sledi 35 reakcionih ciklusa (30 s denaturacije na

94 °C, 30 s vezivanja prajmera na 55 °C i 30 s ekstenzije na 72 °C) i finalna ekstenzija od 7 minuta na 72 °C (Koeleman i sar., 2001). Veličina dobijenih produkata za gen *IntI1* je 160 bp, a za gen *IntI2* je 288 bp.

Amplifikovani fragmenti za gen *bla_{PER-1}* su detektovani i analizirani na 1 % (w/v) agaroznom gelu, dok je za amplifikovane fragmente *bap*, *intI1* i *intI2* gena detekcija vršena na 2 % (w/v) agaroznom gelu. Za vizuelizaciju i fotografisanje gelova korišćen je transiluminator BioDocAnayze (Biometra, Germany) opremljen digitalnom kamerom (Cannon EOS 100D).

Radi poređenja genotipskih osobina *Acinetobacter baumannii* sojeva iz kolekcije kultura sa drugim sojevima čiji su sekvencirani genomi dostupni u bazama, vršena je bioinformatička analiza. *In silico* PCR analiza genoma dostupnih u NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) bazi podataka, u koju je deponovano 30 kompletno sekvenciranih genoma ove vrste, korišćena je za detekciju odabranih gena (*bap*, *bla_{PER-1}*, *intI1* i *intI2*) na osnovu oligonukleotidnih sekvenci korišćenih u ovom radu za PCR (tabela 4.3).

4.1.4.2. RAPD-PCR ANALIZA

Za analizu genetičke srodnosti izolata korišćena je genomska DNK *A. baumannii* sojeva koja je prethodno izolovana i korišćena za identifikaciju izolata. Preliminarno je testirano 10 prajmera (OPA 02, OPA 07, OPA 08, OPB 06, OPB 11, OPB 12, OPB 13, OPN 01, OPN 02 i K 15), od kojih je za analizu odabrano 5 prajmera: OPN-02, OPB-11, K15, OPB-06 i OPA-08, koji su dali zadovoljavajući broj produkata za DNK ispitivanih sojeva (tabela 4.4). Amplifikacija PCR fragmenata je vršena u 15 µL ukupne zapremine reakcione smeše, koja sadrži 75 ng prajmera, 1 U GreenTaq polimeraze, 150 µM dNTPs i 40-300 ng bakterijske DNK u puferu (Green buffer, Thermoscientific). PCR amplifikacija vršena je u 39 reakcionih ciklusa (2 minuta denaturacije na 94 °C, 1 minut vezivanja prajmera na 36 °C i 2 minuta ekstenzije na 72 °C) i finalnom ekstenzijom od 10 minuta na 72 °C. Amplifikovani fragmenti su detektovani na 1 % (w/v) agaroznom gelu.

Tabela 4.4. Oligonukleotidne sekvence za RAPD-PCR analizu *A. baumannii*

Prajmer	Nukleotidna sekvenca	T _m (°C)	GC (%)
OPA-08	5' - GTGACGTAGG - 3'	32	60
OPB-06	5' - TGCTCTGCCC - 3'	34	70
OPB-11	5' - GTAGACCCGT - 3'	32	60
OPN-02	5' - ACCAGGGGCA - 3'	34	70
K15	5' - CTCCTGCCAA - 3'	32	60

Vizuelizacija i fotografisanje gelova je vršeno u transiluminatoru BioDocAnayze (Biometra, Germany) opremljenom digitalnom kamerom (Cannon EOS 100D). Programi Free Tree

(Pavliček i sar., 1999) i Tree View (Roderic, 2001) korišćeni su za konstrukciju kladograma, izračunavanje stepena sličnosti, odnosno udaljenosti sojeva je vršeno primenom Žakarovog koeficijenta (eng. *Jaccard's coefficient*), na osnovu čega je vršeno dalje grupisanje sojeva primenom aglomerativne hijerarhijske metode grupisanja, UPGMA (eng. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Podaci o svim ispitivanim osobinama *A. baumannii* su obrađeni statističkim metodama. Korelacije između ispitivanih karakteristika izolata su utvrđene primenom neparametarskog Kendall tau testa u programu Statistica 10 (StatSoft, Inc., 2011), a razlike u osobinama između izolata poreklom iz rana i prirodne sredine testirane su Wilcoxon-ovim testom, takođe u programu Statistica 10 (StatSoft, Inc., 2011). Utvrđene korelacije i razlike su smatrane statistički značajnim u slučaju kada je $P \leq 0,05$.

4.2. NEKONVENCIONALNI ANTIMIKROBNI AGENSI

Osim osetljivosti na antibiotike, ispitna je i osetljivost *A. baumannii* sojeva iz rana na nekonvencionalne antimikrobne agense. Kao nekonvencionalni agensi testirana su etarska ulja, biljni ekstrakti i njihove odabrane pojedinačne komponente. Etarska ulja su ekstrahovana iz biljaka iz porodica Myrtaceae, Cupressaceae, Asteraceae, Apiaceae i porodice Lamiaceae (tabela 4.5). U svrhu određivanja adekvatnih, potencijalnih antimikrobnih agenasa za tretman infekcija izazvanih vrstom *A. baumannii* korišćeno je ukupno 39 različitih etarskih ulja, izolovanih iz 28 biljnih vrsta. Kao nekonvencionalni antimikrobni agensi korišćeni su još i ekstrakti biljaka iz porodica Polygonaceae, Urticaceae i Alliaceae (tabela 4.5). Analizirana je anti-*Acinetobacter baumannii* aktivnost 14 biljnih ekstrakta, pripremljenih iz 9 različitih biljnih vrsta. Taksonomska determinacija biljnog materijala je urađena na Departamnu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu od strane prof. dr Gorana Anačkova. Primerci svih biljaka korišćenih u radu su zavedeni u Herbarijumu Departamana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu (BUNS Herbarijum) pri čemu je svakom primerku dodeljen vaučer sa određenim brojem (tabela 4.5). Ispitivana je takođe i antibakterijska aktivnost ukupno 15 čistih jedinjenja, od čega su 11 komponente etarskih ulja, dok su preostala 4 komponente biljnih ekstrakata (tabela 4.7).

Tabela 4.5. Podaci o prirodnim, nekonvencionalnim antimikrobnim agensima (etarskim uljima i biljnim ekstraktima) ispitanim u ovom radu

Antimikrobni agens	Familija	Vrsta	Lokalitet	Datum prikupljanja biljnog materijala	Oznaka vaučera u BUNS Herbarijumu	Biljni materijal	Dominantne komponente antimikrobnog agensa	Sadržaj komponente*	Referenca
Etarko ulje	Myrtaceae	<i>Myrtus communis</i> L. subsp. <i>tarentina</i> (L.) Arcang. 1882	Herceg Novi, Republika Crna Gora	januar 2007.	2-1823	list	linalol 1,8-cineol mirtenil-acetat	18,3 16,9 18,0	Tabela 5.8
		<i>Myrtus communis</i> L. subsp. <i>tarentina</i> (L.) Arcang. 1882	Stari Grad Bar, Republika Crna Gora	januar 2007.	2-1819	list	linalol 1,8-cineol miretenil-acetat	26,6 15,8 18,5	Tabela 5.8
		<i>Myrtus communis</i> L. subsp. <i>tarentina</i> (L.) Arcang. 1882	Kotor, Republika Crna Gora	januar 2007.	2-1821	list	linalol 1,8-cineol miretenil-acetat	22,3 13,3 16,6	Tabela 5.8
		<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh. 1832	Herceg Novi, Republika Crna Gora	januar 2007.	2-1816	list	spatulenol kripton p-cimen	18,8 7,6 5,4	Tabela 5.9
		<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh. 1832	Stari Grad Bar, Republika Crna Gora	januar 2007.	2-1812	list	spatulenol kripton p-cimen	21,4 12,2 7,6	Tabela 5.9
		Cupressaceae	<i>Juniperus sabina</i> L. 1753	Mavrovo Galičnik, Republika Makedonija	jul 2010.	2-1789	iglice	sabinen citonelal 4-terpineol	54,3 6,8 6,6
Stara planina, Babin zub, Republika Srbija	jul 2008.			2-1852	iglice šišarke	α -pinen β -pinen α -pinen germakren D	74,5 4,8 50,1 14,3	Lesjak, 2011	
Ostrvo Hvar, Grad Hvar, Republika Hrvatska	avgust 2010.			2-1791	iglice šišarke	α -pinen β -mircen germakren D α -pinen limonen	20,4 34,2 11,2 75,6 8,1	Tabela 5.10 Lesjak, 2011	
Fruška gora, Republika Srbija	oktobar 2013.			2-1649	iglice šišarke	sabinen α -pinen 4-terpineol sabinen α -pinen	29,8 21,0 9,7 28,9 18,4	Prilog 9.9	

						limonen	14,9	
	<i>Juniperus communis</i> L. 1753	Planina Romanija, Bosna i Hercegovaina	avgust 2013.	2-1648	iglice	α -pinen	42,5	Prilog 9.9
					šišarke	sabinen	19,5	
						α -pinen	72,3	
						β -mircen	7,1	
	<i>Juniperus macrocarpa</i> Sibth. et Sm. 1878	Grad Hvar, Republika Hrvatska	avgust 2009.	2-1872	iglice	α -pinen	49,4	Lesjak, 2011
					šišarke	germakren D	18,1	
						α -pinen	47,8	
						germakren D	13,5	
						β -mircen	10,3	
	<i>Juniperus excelsa</i> M. Bieb. 1800	Prespansko jezero, ostrvo Golem Grad, Republika Makedonija	novembar 2009.	2-1875	iglice	α -pinen	30,9	Lesjak, 2011
						limonen	14,8	
						kedrol	37,4	
					šišarke	α -pinen	76,7	
						kedrol	7,7	
	<i>Juniperus phoenicea</i> L. 1753	Grad Hvar, Republika Hrvatska	avgust 2010.	2-1790	iglice	α -pinen	43,6	Lesjak, 2011
						β -felandren	13,4	
						α -pinen	60,9	
					šišarke	germakren D	8,4	Tabela 5.10
	<i>Juniperus foetidissima</i> Willd. 1806	Ohrid, Galičica, Vidikovac, Republika Makedonija	jul 2010.	2-1788	iglice	sabinen	39,9	Lesjak, 2011
						4-terpineol	17,0	
						γ -terpinen	10,1	
Lamiaceae	<i>Hyssopus officinalis</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	-	herba	<i>cis</i> -pinokamfon	50,7	IPA HELICO, 2015; prilog 9.9
						β -pinen	9,1	
						mirtenol	4,0	
	<i>Mentha x piperita</i> L. 1753 "Mitcham"	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1538	herba	menton	41,1	Lesjak i sar., 2015
						mentol	19,1	
						izomenton	11,9	
	<i>Satureja hortensis</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1542	herba	karvakrol	46,7	Lesjak i sar., 2015
						γ -terpinen	32,5	
						α -terpinen	4,2	
	<i>Thymus serpyllum</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	-	herba	timol	37,1	IPA HELICO, 2015; prilog 9.9
						γ -terpinen	8,7	
						p-cimen	8,1	
	<i>Thymus vulgaris</i> L. 1753	Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić"	septembar 2013.	serijski broj 3056011	herba	timol	48,1	Prilog 9.9
						p-cimen	29,5	
						karvakrol	6,0	

	<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>vulgare</i> L.1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1540	herba	kariofilen oksid karvakrol sabinen	15,6 8,4 6,8	Lesjak i sar., 2015
	<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i> (Link.) Ietsw. 1980	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1539	herba	karvakrol γ -terpinen	71,1 8,4	Lesjak i sar., 2015
	<i>Origanum majorana</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1541	herba	terpinen-4-ol γ -terpinen α -terpinen	23,3 16,0 11,0	Lesjak i sar., 2015
	<i>Salvia officinalis</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	-	list	α -tujon kamfor 1,8-cineol	23,9 17,9 14,6	IPA HELICO, 2015; prilog 9.9
	<i>Melissa officinalis</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	-	list	geranial neral kariofilen oksid	25,1 19,4 10,6	IPA HELICO, 2015; prilog 9.9
	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. 1768	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	-	cvet	linalil acetat linalol kamfor 1,8-cineol	22,3 21,2 14,3 10,9	IPA HELICO, 2015; prilog 9.9
	<i>Ocimum basilicum</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	-	list	linalol 1,8-cineol eugenol	35,8 15,7 12,8	IPA HELICO, 2015; prilog 9.9
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1537	herba	1,8-cineol kamfor α -pinen	44,4 10,9 10,2	Lesjak i sar., 2015
Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. 1768	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1535	plod	E-anetol fenchon estragol	80,1 7,8 5,2	Lesjak i sar., 2015
	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) A.W.Hill 1925 "Commun"	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1534	list	1,3,8-mentatrien δ -kadinen α -pinen β -pinen	19,9 16,8 14,0 10,1	IPA HELICO, 2015; prilog 9.9
	<i>Coriandrum sativum</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	-	plod	linalol γ -terpinen	73,6 4,6	IPA HELICO, 2015; prilog 9.9
Asteraceae	<i>Artemisia dracunculus</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1533	list	metil eugenol sabinen	72,3 12,4	Lesjak i sar., 2015

		<i>Achillea millefolium</i> L. 1753	Organska farma "Farago", Orom, Vojvodina, Srbija	septembar 2013.	2-1536	cvet	sabinen germacren D β -pinen	16,3 14,7 10,3	Lesjak i sar., 2015
Biljni ekstrakt	Polygonaceae	<i>Rumex sanguineus</i> L.1753	Zmajevac, Fruška gora, Republika Srbija	jun 2012.	2-1735	herba rizom	katehin naringenin katehin epikatehin	12310,0 683,0 3604,0 766,0	Svirčev, 2014
		<i>Rumex sanguineus</i> L.1753	Iriški venac, Fruška gora, Republika Srbija	jun 2012.	2-1736	herba rizom	katehin galana kiselina katehin epikatehin	16631,0 661,0 3487,0 658,0	Rokvić, 2013
		<i>Rumex crispus</i> L.1753	Tara, Republika Srbija	jun 2010.	2-1721	herba rizom	katehin emodin katehin emodin	41957,0 2601,0 13248,0 2271,0	Svirčev, 2014
Urticaceae		<i>Urtica dioica</i> L. 1753	Fruška gora, Republika Srbija	2011.	2-1590	herba	kafeoilhinska k. rutin	5700,0 1430,0	Orčić i sar., 2014
		<i>Urtica dioica</i> L. 1753	Stara planina, Republika Srbija	2011.	2-1591	herba	kafeoilhinska k. rutin	17400,0 7300,0	Orčić i sar., 2014
Alliaceae		<i>Allium melanantherum</i> Panč. 1883	Čemernik, Republika Srbija	jul 2009.	2-1800	cela biljka	rutin ferulna kiselina izokvercitrin	~126990,0 ~1488,0 ~1079,0	Simin, 2014
		<i>Allium fuscum</i> Waldst. et Kit 1807	Zaovine, Republika Srbija	jul 2010.	2-1776	cela biljka	rutin izokvercitrin hinska kiselina kvercetin	~11358,0 ~2017,0 ~1137,0 ~794,0	Simin, 2014
		<i>Allium paniculatum</i> L. 1759 subsp. <i>marginatum</i> (Janka) Soó 1972	Titelski breg, Republika Srbija	jul 2009.	2-2050	cela biljka	rutin izokvercitrin	~25373,0 ~6758,0	Simin, 2014
		<i>Allium rhodopeum</i> Velen. 1890	Dimitrovgrad, Republika Srbija	jul 2009.	2-1780	cela biljka	izokvercitrin hinska kiselina	~3000,0 ~689,0	Simin, 2014
		<i>Allium cepa</i> L. 1753, gajeni	Neradin, Republika Srbija	jul 2010.	2-1762	cela biljka	-	-	Simin, 2014
		<i>Allium sativum</i> L. 1753, gajeni	Šajkaš, Republika Srbija	jul 2010.	2-1622	cela biljka	-	-	Simin, 2014

* sadržaj komponenti etarskih ulja je izražen kao relativni udeo (%) ukupne površine pikova u GC-MS hromatogramu, sadržaj komponenti ekstrakta je izražen u $\mu\text{g/g}$ suvog ekstrakta

4.2.1. EKSTRAKCIJA I KARAKTERIZACIJA ETARSKIH ULJA

Od 39 korišćenih etarskih ulja, 7 etarskih ulja (5 iz porodice Myrtaceae i 2 iz porodice Cupressaceae - *Juniperus oxycedrus* (iglice, Hvar) i *Juniperus phoenicea* (šišarke, Hvar)) je izolovano i okarakterisano u ovom radu, hemijski sastav etarskih ulja iglica i šišarki vrste *J. communis* sa loklita Fruška gora i Planina Romanija predstavljen je u prilogu 9.9, dok je hemijski sastav etarskih ulja stalih vrsta iz roda *Juniperus* prethodno određen u referenci Lesjak (2011). Etarska ulja iz porodica Lamiaceae, Apiaceae i Asteraceae su takođe ranije izolovana i okarakterisana u okviru projekta IPA HELICO (2013-2015) (prilog 9.9). Hemijski sastav etarskih ulja vrsta *S. hortensis*, *O. vulgare* subsp. *vulgare*, *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *M. x piperita*, *O. majorana*, *R. officinalis*, *F. vulgare*, *A. millefolium* i *A. dracuncululus* je dat u radu Lesjak i sar. (2015).

Za izolaciju etarskih ulja primenjena je metoda hidrodestilacije po Ph. EUR. IV (European Pharmacopeia, 2002), uz n-heksan kao rastvarač. Postupak izolacije je podrazumevao da se 100 g usitnjenog biljnog materijala prelije sa 1000 mL destilovane vode u balonu okruglog dna. Vreme destilacije iznosilo je 2 h i 30 min. Dobijeno etarsko ulje sušeno je pomoću anhidrovanog Na₂SO₄ u toku 24 h. Nakon ceđenja, n-heksan je uparen na rotacionom vakuum-uparivaču.

Kvalitativna i semikvantitativna analiza sastava etarskih ulja ispitivanih aromatičnih biljaka rađena je na gasnom hromatografu sa masenospektrometrijskim detektorom (GC-MS). Rastvor etarskog ulja u n-heksanu, koncentracije 1 nL/mL, analiziran je GC-MS tehnikom, koristeći Agilent Technologies 6890N gasni hromatograf sa 5975B masenim spektrometrom. Injektovano je 1,0 µL uzorka u *split/splitless* inlet temperature 250 °C, u split modu (split odnos 1:10). Kao gas nosač korišćen je helijum čistoće 99,999 %, u režimu konstantnog protoka od 1,0 mL/min. Za razdvajanje je korišćena semipolarna HP-5ms (Agilent Technologies) kapilarna kolona na bazi polidimetilsiloksana sa 5 % fenil-grupa, dimenzija 30 m × 0,25 mm, debljine sloja 0,25 µm. Temperaturni program podrazumevao je početnu temperaturu od 50 °C, zagrevanje brzinom 8 °C/min do 120 °C, 15 °C/min do 230 °C, i 20 °C/min do 270 °C, i zadržavanje na 270 °C tokom 16,92 min (ukupno trajanje analize 35 min). Razdvojene komponente analizirane su na masenom spektrometru sa elektronskom jonizacijom, uz parametre: temperatura transfer-linije 280 °C, temperatura jonskog izvora 230 °C, energija elektrona 70 eV, temperatura kvadrupola 150 °C. Akvizicija je izvedena u *scan* modu, u *m/z* opsegu 35–400. Instrument je tjuniran korišćenjem *Standard spectra tune-a* u cilju bolje korelacije masenih spektara sa spektralnim bibliotekama korišćenim za identifikaciju.

Podaci su obrađeni korišćenjem Agilent Technologies MSD ChemStation softvera (revizija E01.01.335). Za dekonvoluciju masenih spektara koeluirajućih pikova upotrebljen je AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, ver. 2.64) u kombinaciji sa NIST MS Search softverom (ver. 2.0d). NIST MS Search je dodatno pružio

algoritam za pretragu biblioteka komplementaran PBM algoritmu ChemStation softvera. Za identifikaciju masenih spektara korišćene su spektralne biblioteke Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th Edition (338000 spektara, 289000 jedinjenja) (McLafferty, 2005) i NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05 (190825 spektara, 163198 jedinjenja) (NIST/EPA/NIH, 2005). Pošto u slučaju oksidovanih derivata terpena maseni spektri nisu dovoljni za jednoznačnu identifikaciju, identitet jedinjenja potvrđen je poređenjem Kovats-evih retencionih indeksa (KI) sa literaturnim podacima (Adams, 2001). Kao standard za određivanje KI korišćeno je dizel-ulje (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$), za koga je analizom potvrđeno da sadrži u značajnom udelu smešu svih *n*-alkana u opsegu C₈–C₂₄, što odgovara Kovats indeksu 800–2400 (prilog 9.3 i 9.4).

4.2.2. KARAKTERISTIKE BILJNIH EKSTRAKATA

Ekstrakti biljaka roda *Allium* dobijeni ljubaznošću dr Nataše Simin, ekstrakti biljaka roda *Rumex* su dobijeni ljubaznošću dr Emilije Svirčev, dok su ekstrakti roda *Urtica* dobijeni ljubaznošću dr Marine Francišković. Metoda pripreme ekstrakata biljaka iz rodova *Rumex* i *Allium*, kao i njihov hemijski sastav prikazani su u referencama Svirčev (2014), Rokvić (2013) i Simin (2014), dok se informacije o ekstraktima biljaka roda *Urtica* nalaze u radu Orčić i sar. (2014). Pregled korišćenih ekstrakata dat je tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Biljni ekstrakti testirani kao nekonvencionalni anti-*A. baumannii* agensi

Biljna vrsta	Oznaka ekstrakta*	Koncentracija ekstrakta (mg mL ⁻¹)	Rastvarač
<i>Rumex sanguineus</i>	4NZ_H_p	291,2	70 % etanol
	4NZ_R	291,2	
	4Z_H_p	291,2	
	4H_R	295,0	
<i>Rumex crispus</i>	171	199,4	100 % DMSO
	179	200,5	
<i>Urtica dioica</i>	Ud 9-H	300,0	80 % metanol
	Ud 10-H	300,0	
<i>Allium melanantherum</i>	Am	200,0	70 % metanol
<i>Allium fuscum</i>	Aff	200,0	
<i>Allium paniculatum</i> subsp. <i>marginatum</i>	Apm	200,0	
<i>Allium rhodopeum</i>	Ar	200,0	
<i>Allium cepa</i>	Ac	200,0	
<i>Allium sativum</i>	As	200,0	

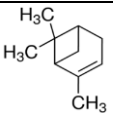
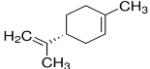
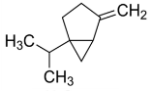
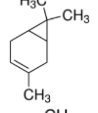
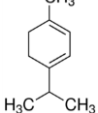
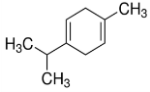
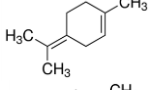
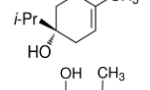
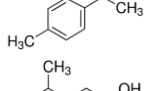
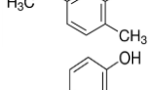
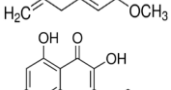
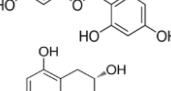
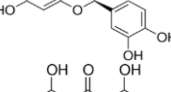
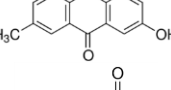
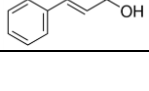
* H-herba, R-rizom, NZ- livada na Zmajevcu, Z-Iriški venac; DMSO-dimetilsulfoksid, Ud 9 – Fruška gora, Ud 10 – Stara planina

4.2.3. STANDARDNA JEDINJENJA

Kako bi se utvrdilo koje komponente su odgovorne za antimikrobnu aktivnost ekstrakata i etarskih ulja, uporedo su ispitivane i njihove dominantne komponente (tabela 4.5). Tako je ispitana antimikrobna aktivnost 15 čistih hemijski sintetisanih supstanci (tabela 4.7). Od jedanaest komponenti etarskih ulja korišćenih za utvrđivanje antibakterijske aktivnosti protiv

A. baumannii sedam su iz grupe monoterpenkih ugljovodonika (α -pinen, (R)-(+)-limonen, sabinen, 3-karen, α -terpinen, γ -terpinen, terpinolen), tri iz grupe oksidovanih monoterpena ((-)-terpinen-4-ol, timol i karvakrol), dok jedna pripada fenilpropanoidima (eugenol). Od bioaktivnih komponenti ekstrakata ispitana su četiri fenolna jedinjenja - kvercetin, cimetna kiselina, katehin i emodin. Sva standardna jedinjenja nabavljena su od Sigma-Aldrich, USA.

Tabela 4.7. Standardna jedinjenja korišćena u ispitivanjima antimikrobne aktivnosti

Bioaktivna komponenta	Strukturna formula	Hemijska klasa	Čistoća (%)	Gustina (g mL ⁻¹)	Molekulska masa (g mol ⁻¹)
α -pinen		terpen	98,0	0,858	136,23
(R)-(+)-limonen		terpen	97,0	0,842	136,23
sabinen		terpen	75,0	0,842	136,23
3-karen		terpen	90,0	0,857	136,23
α -terpinen		terpen	$\geq 89,0$	0,837	136,23
γ -terpinen		terpen	97,0	0,850	136,23
terpinolen		terpen	$\geq 90,0$	0,861	136,23
(-)-terpinen-4-ol		oksidovani derivat terpena	$\geq 95,0$	0,934	154,25
timol		oksidovani derivat terpena	$\geq 99,0$	0,965	150,22
karvakrol		oksidovani derivat terpena	98,0	0,976	150,22
eugenol		fenilpropanoid	99,8	1,067	164,20
kvercetin		flavonoid	$\geq 95,0$	1,800	338,27
katehin		flavan-3-ol	$\geq 98,0$	-	290,27
emodin		antrahinon	$\geq 90,0$	-	270,24
cimetna kiselina		karboksilna kiselina	97,0	1,250	148,16

4.3. OSETLJIVOST *A. baumannii* IZOLATA NA NEKONVENCIONALNE ANTIMIKROBNE AGENSE

Radi pronalaženja potencijalnih alternativnih rešenja za eradikaciju *A. baumannii* ispitivana je efikasnost nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa i to etarskih ulja i biljnih ekstrakata. Takođe, utvrđen je efekat ovih agenasa na biofilm, kao i potencijani mehanizmi njihovog delovanja na ćelije *A. baumannii*.

MIC nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa je takođe određivana primenom modifikovane metode za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti (Rahman i sar., 2004; Eloff, 2004). Najpre su u mikrotitar pločama pripremljena dvostruka razređenja testiranih antimikrobnih agenasa (etarskih ulja i biljnih ekstrakata).

Razređenja etarskih ulja su pravljena u sterilnoj destilovanoj vodi sa dodatkom DMSO-a, zbog poboljšanja rastvorljivosti ulja, pri čemu je njegova finalna koncentracija iznosila $\leq 0,8$ %, a finalne koncentracije svakog etarskog ulja u mikrotitar ploči kretala su se od 0,125 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Aktivnost etarskih ulja u većim koncentracijama nije testirana, jer prevazilaze doze koje se mogu aplicirati u *in vivo* uslovima.

Za razliku od etarskih ulja, finalne koncentracije svakog ekstrakta u mikrotitar ploči iznosile su od 0,25 do 8 mg mL^{-1} , pri čemu finalne koncentracije rastvarača biljnih ekstrakata nisu prelazile vrednosti 1,4 % za metanolne ekstrakte, 1,9 % za etanolne i 1 % za ekstrakte pravljene u DMSO-u. Razređenja ekstrakata su pripremana u sterilnoj destilovanoj vodi. U sve eksperimente su uključene i kontrole maksimalnih koncentracija rastvarača u finalnoj zapremini (metanol, etanol, DMSO) radi utvrđivanja moguće inhibicije bakterijskog rasta.

Kao i prilikom određivanja MIC vrednosti konvencionalnih antibiotika, pripremljene bakterijske suspenzije gustine 0,5 McFarland razređene su u tečnoj dvostruko koncentrovanoj Mueller Hinton podlozi (HiMedia, Indija) u odnosu 1:100 (v/v). Ovako zasejana podloga dodata je u bunarčice mikrotitar ploče u istom volumenu kao i razređeni agens (1:1, v/v), a finalna zapremina suspenzije u svakom bunarčiću je iznosila 200 μL . Brojnost bakterija u testu iznosila je oko 1×10^6 CFU mL^{-1} . Referentni sojevi *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 su takođe testirani i korišćeni su kao kontrola. Mikrotitar ploče su inkubirane preko noći na 37 °C, nakon čega je u svaki bunarčić dodato 10 μL 1 % rastvora TTC-a i mikrotitar ploče su dodatno inkubirane 2 h na 37 °C, do pojave crvene boje. Najmanja koncentracija etarskog ulja potrebna da spreči pojavu crvene boje, tj. formiranje formazana smatrana je MIC vrednošću. Rezultati su predstavljeni tabelarno, u vidu vrednosti geometrijske sredine za najmanje dva nezavisna ponavljanja sa standardnom devijacijom.

MBC vrednost je određena i predstavljena na isti način kao i prilikom utvrđivanja MBC vrednosti konvencionalnih antibiotika.

4.3.1. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA BIOFILM *A. baumannii* IZOLATA

Dalje utvrđivanje efikasnosti etarskih ulja vršeno je na osnovu detektovanog stepena njihovih anti-*A. baumannii* aktivnosti. Za potrebe ispitivanja efekta koji etarska ulja ostvaruju na biofilm odabrana su etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis*. Ova ulja ispunjavaju određene kriterijume, koji su uzeti u obzir na osnovu postavljenih ciljeva istraživanja, a osnovni kriterijum je da su ulja ispoljila značajan anti-*A. baumannii* efekat. Osim toga, odabrana ulja su zanimljiva sa aspekta slabo istraženih ulja, i nisu testirana ranije kao potencijalni inhibitori ovog kompleksnog procesa, kao ni protiv genomske vrste *A. baumannii*. Takođe, prema hemijskom sastavu ne sadrže ni jednu komponentu sa udelom većim od 30 %, što potencijano isključuje aktivnost jedne dominantne komponente, već sugerise udruženo delovanje komponenti. Još jedan od kriterijuma, predstavljala je prijavljena toksičnost pojedinih ulja i njihovih komponenti u literaturi. Osim toga, etarska ulja ove dve vrste su ekstrahovana iz biljaka prikupljenih sa različitih lokaliteta, što omogućava komparaciju rezultata u ovom radu, što predstavlja još jedan od razloga odabira ovih ulja za dalje analize.

4.3.1.1. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA FORMIRANJE BIOFILMA

Kvantifikacija formiranog biofilma pri ispitivanju efekta etarskih ulja na njegovo formiranje izvršeno je modifikovanom metodom u mikrotitar pločama koja je korišćena za procenu potencijala bakteriofaga da inhibiraju formiranje biofilma (Knezevic i Petrovic, 2008b). Ispitivan je efekat pet etarskih ulja (MyHN, MyK, MyB, EuHN, EuB) na proces formiranja biofilma osam odabranih *A. baumannii* izolata (Aba-2572, Aba-4804, Aba-5055, Aba-8781, Aba-8833, Aba-3496, Aba-4010 i ATCC 19606). Izolati su odabrani na osnovu kriterijuma prethodno utvrđenog potencijala da formiraju biofilm, kao i stepena osetljivosti na konvencionalne antimikrobne agense. Sojevi Aba-4804, Aba-5055 i Aba-8781 su okarakterisani kao dobri producenti biofilma, sojevi Aba-2572, Aba-8833, Aba-3496 su okarakterisani kao slabiji producenti, dok je soj Aba-4010 produkovao biofilm u umerenoj količini u poređenju sa ostalim sojevima. Takođe, izolati Aba-8781, Aba-8833, Aba-3496 i ATCC 19606 su okarakterisani kao osetljiviji, dok su izolati Aba-2572, Aba-4804, Aba-5055, Aba-4010 bili rezistentni na većinu ispitivanih antimikrobnih agenasa. Sadržaj bunarčića u pločama bio je identičan onome pri određivanju potencijala *A. baumannii* izolata da formiraju biofilm, uz dodatak etarskih ulja u koncentracijama od 0,125 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, tj. koncentracijama etarskog ulja identičnim onima u testovima ispitivanja inhibicije rasta bakterija. Negativna kontrola je rađena u triplicatu i sadržala je neinkulisanu podlogu i sterilnu dH₂O, a pozitivna kontrola (za svaki od testiranih sojeva) je sadržala inkulisanu podlogu i sterilnu dH₂O. Bakterijske kulture su gajene u Mueller Hinton podlozi, a nakon inkubacije od 24 časa biofilm je kvantifikovan. Apsorbanca u bunarčićima mikrotitar ploče

merena je na 595 nm na čitaču mikrotitar ploča MultiscanGo (Thermo scientific, Finland). Ceo eksperiment je izveden u tri nezavisna ponavljanja. Izračunavanja stepena produkcije biofilma vršena su primenom Microsoft Excel softvera gde su dobijene OD vrednosti stepena produkovanog biofilma pod uticajem etarskih ulja najpre umanjene za negativnu kontrolu, a zatim proporcionalno upoređene sa pozitivnom kontrolom koja je predstavljala maksimalnu vrednost produkcije biofilma jednog soja. Rezultati su izraženi procentualno i predstavljeni grafički primenom programa KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software, USA). Takođe, određene su biofilm inhibitorne koncentracije (BIC) za korišćena etarska ulja, koje su očitavane kao najniža koncentracija etarskog ulja pri kojoj je izostala očigledna pojava ljubičaste boje kristal violeta.

Neposredno pre kvantifikacije formiranog biofilma vršena je kvantifikacija planktonskih ćelija u mikrotitar pločama, radi utvrđivanja efekta etarskih ulja na planktonske ćelije u medijumu tokom procesa formiranja biofilma. Nakon inkubacije od 24 časa, tokom koje su različite koncentracije etarskih ulja uticale na proces formiranja biofilma i planktonske ćelije prisutne u medijumu tokom ovog procesa, suspenzija planktonskih ćelija je prebačena u nove mikrotitar ploče i u sve bunarčiće je dodata podloga Mueller Hinton bujon (HiMedia, Indija) i 1 % rasvor TTC-a u odnosu 5:14:1 (v/v/v) pri čemu je 200 μL bila finalna zapremina u svakom bunarčiću. Mikrotitar ploče su inkubirane 3 h na 37 °C, a apsorbancija je očitana na 540 nm na čitaču mikrotitar ploča MultiscanGo (Thermo Scientific, Finland). Rezultati kvantifikacije planktonskih ćelija su izračunati na isti način kao i prilikom određivanja efekta ulja na proces formiranja biofilma i predstavljeni grafički primenom programa KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software, USA). Kao i u slučaju formiranja biofilma, određene su inhibitorne koncentracije planktonskih ćelija prisutnih u medijumu (PIC) za korišćena etarska ulja, koje su očitavane kao najniža koncentracija etarskog ulja pri kojoj je izostala pojava crvene boje formazana nakon dodatka TTC-a.

4.3.1.2. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA FORMIRANI BIOFILM

Ispitivanje efekta etarskih ulja na formiran biofilm izvršeno je na način sličan prethodnom, modifikovanom metodom u mikrotitar pločama (Knezevic i Petrovic, 2008b). Ispitana je mogućnost uklanjanja formiranog biofilma osam sojeva Aba-2572, Aba-4804, Aba-5055, Aba-8781, Aba-8833, Aba-3496, Aba-4010 i ATCC 19606, odabranih po istim kriterijumima kao u prethodnom eksperimentu. Uklanjanje formiranog biofilma ispitano je upotrebom pet etarskih ulja (MyHN, MyK, MyB, EuHN, EuB), koja su pokazala značajnu antimikrobnu aktivnost. Testirane su koncentracije etarskih ulja 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 i 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Nakon formiranja biofilma u toku 24 časa uklonjen je sadržaj iz svih bunarčića, ploče su jednom isprane u 250 μL PBS pufera (pH 7.4), a zatim je dodato 100 μL odgovarajuće koncentracije etarskog ulja i ista količina dvostruko koncentrovane Mueller Hinton podloge, kako bi se zadržali potpuno istovetni uslovi kao u prethodnom eksperimentu. Nakon

inkubacije tokom 24 časa na 37 °C, bunarčići mikrotitar ploča su isprani dva puta u 250 µL PBS pufera, a biofilm je kvantifikovan na isti način opisan u prethodnom testu. Apsorbanca je merena na 595 nm na čitaču mikrotitar ploča MultiscanGo (Thermo Scinetific, Finland). Eksperiment je izveden u tri nezavisna ponavljanja, a rezultati su izračunati i predstavljeni grafički upotrebom programa KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software, USA), kao i prilikom utvrđivanja efekta etarskih ulja na proces formiranja biofilma, a takođe, određene su koncentracije uklanjanja biofilma (BEC, eng. *biofilm eradication concentration*) za korišćena etarska ulja, koje su očitavane kao najniža koncentracija etarskog ulja pri kojoj je izostala pojava ljubičaste boje kristal violeta.

Efekat etarskih ulja na planktonske ćelije u medijumu iznad formiranog biofilma je kvantifikovan u mikrotitar pločama nakon tretmana formiranog biofilma etarskim uljima, jer je posle ispiranja mikrotitar ploča PBS puferom i dodatka etarskih ulja i nove podloge došlo do oslobađanja dela planktonskih ćelija iz formiranog biofilma. Kao i u prethodnom eksperimentu, iz bunarčića mikrotitar ploče u kojoj je ispitivan efekat etarskih ulja na formirani biofilm, suspenzija planktonskih ćelija u medijumu je prebačena u novu mikrotitar ploču sa dvosturko koncentrovanom podlogom Mueller Hinton bujon (HiMedia, Indija) i 1 % rastvor TTC-a (5:14:1, v/v/v), finalne zapremine pripremljene suspenzije 200 µL u svakom bunarčiću. Mikrotitar ploče su inkubirane 3 h na 37 °C, a apsorbanca je očitana na 540 nm na čitaču mikrotitar ploča MultiscanGo (Thermo Scinetific, Finland). Ceo eksperiment je izveden u tri nezavisna ponavljanja, a rezultati su izračunati i predstavljeni na isti način kao i prilikom određivanja stepena uklonjenog biofilma. Kao i prilikom uklanjanja biofilma, za korišćena etarska ulja određene su koncentracije uklanjanja planktonskih ćelija prisutnih u medijumu iznad formiranog biofilma (PEC, eng. *planktonic cell eradication cocncetration*), koje su očitavane kao najniža koncentracija etarskog ulja pri kojoj je izostala pojava crvene boje formazana nakon dodatka TTC-a.

4.3.2. BIOAUTOGRAFSKA ANALIZA EFEKTA ETARSKIH ULJA I BILJNIH EKSTRAKATA

Razdvajanje komponenti ispitivanih etarskih ulja je vršeno metodom tankoslojne hromatografije (Horvath i sar., 2010). Hromatografija je izvođena na silika gel 60 F₂₅₄ aluminijumskim listovima TLC ploča (Merck, Germany), dimenzija 10 × 20 cm. Pre upotrebe, ploče su sterilisane u toku 3 h na 120 °C u suvom sterilizatoru (Binder, Nemačka).

Rastvor etarskog ulja je pripremljen tako što je etarsko ulje rastvoreno u etanolu (1:50, v/v), a 4 µL ovog rastvora (ekvivalentno 0,08 µL nerastvorenog ulja) je nanoseno na TLC ploču. Pozicija startne linije je 1,5 cm od donjeg kraja ploče i 1,5 cm od leve strane ploče. Nakon nanošenja uzoraka analiziranih etarskih ulja, TLC ploče su razvijane u prethodno optimizovanoj mobilnoj fazi. Za razdvajanje komponenti etarskog ulja korišćena je mobilna faza toluen-etil acetat (93:7, v/v) (Wagner i Bladt, 2001). Razvijanje je vršeno na sobnoj

temperaturi u kadici za tankoslojnu hromatografiju. Nakon hromatografskog razdvajanja, obeležen je front rastvarača i TLC ploče su osušene u sušnici 5 minuta na 90 °C radi potpunog uklanjanja rastvarača. Akohol–vanilin–sumporna kiselina reagens je korišćen za vizuelizaciju razdvojenih komponenti etarskih ulja (Wagner i Bladt, 2001). TLC ploče su isprskane reagensom i zagrevane 5 minuta na 100 °C. Detekcija razdvojenih komponenti je vršena prema Rf vrednosti i boji mrlja nakon vizuelizacije. Razdvajanje komponenti etarskih ulja je vršeno u triplikatu, pri čemu je jedna ploča služila za vizuelizaciju razdvojenih komponenti, a druge dve su korišćene za bioautografsku analizu etarskih ulja.

Tankoslojna hromatografija biljnih ekstrakata je vršena na isti način uz male modifikacije. Na TLC ploču je nanošeno 10 µL (10 mg mL⁻¹) svakog ekstrakta u vidu uzane trake. Nakon sušenja uzorka, ploča je razvijana u mobilnoj fazi etil acetat-mravlja kiselina-glacijalna sirćetna kiselina-voda (100:11:11:26, v/v/v/v). Za vizuelizaciju razdvojenih komponenti ekstrakata, TLC ploča je prskana rastvorom Nturstoff reagensa A i posmatrana pod UV svetlom (254-365 nm).

Antibakterijska aktivnost dominantnih komponenti etarskih ulja i biljnih ekstrakata je ispitivana pomoću direktne bioautografije na referentnom soju ATCC 19606. Na osnovu rasporeda vizuelizovanih mrlja na TLC ploči, isečene su druge dve netretirane TLC ploče na trake (jedna traka odgovara jednom razdvojenom etarskom ulju) i na kvadratiće (svaki sa po jednom detektovanom mrljom komponenta analiziranih ulja). Ovako pripremljeni delovi TLC ploča su postavljeni na površinu Mueller Hinton agara (HiMedia, Indija) i potom prelivevi otopljenom polutečnom podlogom* u koju je dodata suspenzija bakterija (2×10⁸ CFU mL⁻¹) i 1 % rastvor TTC-a (30:1:1, v/v/v). Petri ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, praćeno je odsustvo bakterijskog rasta na mestima na kojima se nalaze odgovarajuće komponente etarskih ulja, kao rezultat antimikrobne aktivnosti. TTC je služio da bi olakšao vizuelizaciju prisustva, tj. odsustva rasta bakterije. Zone inhibicije vidljive su kao prozirne zone naspram crveno obojenog rasta bakterija. TLC ploče su fotografisane pomoću Cannon EOS 100D kamere.

4.3.3. OSETLJIVOST *A. baumannii* NA BIOLOŠKI AKTIVNE KOMPONENTE PRIRODNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA

Anti-*A. baumannii* efekat pojedinačnih bioaktivnih komponenti prirodnih antimikrobnih agenasa je utvrđen primenom modifikovane metode za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti (Rahman i sar., 2004; Eloff, 2004), korišćene i za utvrđivanje efekta prirodnih antimikrobnih agenasa (biljnih ekstrakata i etarskih ulja). Pripremljena su dvostruka razređenja agenasa u mikrotitar pločama tako da su se finalne koncentracije komponenti etarskih ulja u mikrotitar ploči kretale od 0,015 do 32 mg mL⁻¹ za α-pinen, terpinen-4-ol, limonen, γ-terpinen, α-

* Tripton 10,00 g L⁻¹, natrijum hlorid 5,00 g L⁻¹, agar 6,50 g L⁻¹.

terpinen, terpinolen i 3-karen, od 0,5 do 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za komponente sabinen, eugenol, timol i karvakrol, dok se koncentracija komponenti biljnih ekstrakata (kvercetin, katehin, cimetna kiselina i emodin) u mikrotitar ploči kretala od 0,125 do 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$, zbog raspoloživih količina supstanci. Razređenja komponenti su pravljena u sterilnoj destilovanoj vodi, a finalna koncentracija rastvarača koji je korišćen za rastvaranje supstanci biljnih ekstrakata (metanol ili DMSO) nije prelazila 1 %. U eksperiment su uključene i kontrole bakterijskog rasta u prisustvu samo rastvarača u medijumu.

Za utvrđivanje antibakterijske aktivnosti bioaktivnih komponenti korišćen je referentni soj ATCC 19606 i tri multiplo rezistentna izolata iz rana (Aba-4156, Aba-4914 i Aba-5055) koji su ispoljili najveći stepen rezistencije na konvencionalne antimikrobne agense (imali su najviše MIC vrednosti). Bakterijske suspenzije, inkubacija i očitavanje rezultata je vršeno na isti način kao i prilikom utvrđivanja efekta etarskih ulja i biljnih ekstrakata. Dobijene MIC vrednosti su predstavljene tabelarno, u vidu vrednosti geometrijske sredine za najmanje tri nezavisna ponavljanja sa standardnom devijacijom.

Određivanje korelacije između različitih fenotipskih i genotipskih osobina *A. baumannii* sojeva sa njihovom osetljivošću na nekonvencionalne antimikrobne agense je takođe vršeno primenom neparametarskog Kendall tau testa u programu Statistica 10 (StatSoft, Inc., 2011), a korelacije su smatrane statistički značajnim u slučaju kada je $P \leq 0,05$.

4.3.4. UTVRĐIVANJE MEHANIZMA DELOVANJA ETARSKIH ULJA

Utvrdjivanje mehanizma delovanja etarskih ulja vršeno je primenom skenirajuće elektronske mikroskopije, kao i primenom metoda za utvrđivanje stepena oslobođenih proteina, lipida i ugljenih hidrata iz ćelija *A. baumannii*.

4.3.4.1. SKENING ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA *A. baumannii*

Ispitivanje mehanizma delovanja etarskih ulja na *Acinetobacter baumannii* vršeno je i skenirajućom elektronskom mikroskopijom ćelija tretiranih etarskim uljima.

Od prekonocne kulture *A. baumannii* ATCC 19606 napravljene su suspenzije gustine 0,5 Mc Farland (2×10^8 CFU mL^{-1}) u sterilnom 0,9 % fiziološkom rastvoru. Sterilna podloga Lauri Bertani broth (HiMedia, Indija) je inokulisana pripremljenom suspenzijom bakterijskih ćelija u odnosu 10:1 (v/v), a potom je inkubirana 5 h na 37 °C do dostizanja eksponencijalne faze rasta. Ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta su tretirane 3 h na 37 °C MIC vrednostima etarskih ulja *Myrtus comunis*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Satureja hortensis* i *Tymus serpyllum*. Kao kontrola korišćene su ćelije tretirane rastvaračem dimetilsulfoksidom

(DMSO) u koncentraciji 0,8 % i potpuno netretirane ćelije. Nakon isteka perioda inkubacije ćelije su centrifugirane 10 minuta na 5000×g i isprane u 0,1 M fosfatnom puferu*.

Za elektronsku mikroskopiju, prethodno pripremljene suspenzije bakterijskih ćelija su isprane u PBS puferu centrifugiranjem na 2000×g u toku 5 minuta, a potom su fiksirane primenom kombinacije 1,0 % glutaraldehida i 0,5 % paraformaldehida u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7.4) na 4 °C. Fiksirane ćelije su nanosene na prethodno očišćena pokrovna stakla, isprane PBS puferom radi uklanjanja viška ćelija nevezanih za površinu stakla, i post-fiksirane primenom 1 % osmijum tetroksida (OsO₄) u trajanju od jednog sata na 4 °C. Nakon ispiranja dejonizovanom vodom, ćelije na pokrovnom staklu su dehidratirane u seriji rastućih koncentracija etanola (50 %, 80 % i 96 % etanola u trajanju od 3 minuta), osušene primenom heksametildisilazana (HMDS), postavljene na aluminijumska postolja i presvučene platinom (Kostanjšek i Pirc-Marolt, 2015). Ćelije su vizuelizovane i fotografisane skenirajućim elektronskim mikroskopom JEOL JSM-7500F sa emisionim poljem (JEOL Ltd., Japan).

4.3.4.2. TRETMAN *A. baumannii* ĆELIJA ZA UTVRĐIVANJE MEHANIZMA DELOVANJA ETARSKIH ULJA

Potencijalno utvrđivanje mehanizma delovanja etarskih ulja vršeno je primenom različitih metoda, pri čemu su najpre pripremljene suspenzije ćelija *A. baumannii* tretirane odabranim etarskim uljima, koje su potom korišćene za dalje analize. Ćelije referentnog soja ATCC 19606 u eksponencijalnoj fazi rasta na podlozi Lauria Bertani broth (HiMedia, Indija) iscentrifugirane su na 5000 ×g u toku 15 minuta i potom tri puta isprane u fosfatnom puferu (pH 7.2). Od ispranih ćelija napravljene su suspenzije gustine 0,5 McFarland (2×10⁸ CFU mL⁻¹). Ovako pripremljene suspenzije bakterijskih ćelija su tretirane etarskim uljima 13 biljnih vrsta (*Myrtus communis*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Juniperus sabina*, *Juniperus sibirica*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, *Artemisia dracuncululus*, *Foeniculum vulgare*, *Hissopus officinalis*, *Mentha x piperita*, *Origanum majorana*, *Satureja hortensis* i *Thymus srepillum*) odabranih prema kriterijumu prethodno detektovane anti-*A. baumannii* aktivnosti. U bakterijsku suspenziju dodato je etarsko ulje finalne koncentracije 1/8×MIC, 1/4×MIC, 1/2×MIC, 1×MIC ili 2×MIC. Ćelije su inkubirane 1 h na 37 °C uz agitaciju. Nakon isteka perioda inkubacije suspenzije su iscentrifugirane na 12000 ×g u toku 2 minuta (Lv i sar., 2011). Supernatant je prebačen u nove epruvete i za dalje analize čuvan u frižideru (4 °C).

Korelacija između primenjenih koncentracija etarskih ulja u tretmanu ćelija za ispitivanje njihovog mehanizma delovanja i stepena osobođenih proteina, ugljenih hidrata i lipida iz ćelija određena je Kendall tau testom u programu Statistica 10 (StatSoft, Inc., 2011), a korelacija su smatrane statistički značajnim u slučaju kada je P≤0,05.

* 0.1 M natrijum dihidrogenfosfat 48 mL, 0.1 M natrijum hidrogenfosfat 152 mL; pH 7.2.

4.3.4.3. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA OSLOBODANJE PROTEINA IZ ČELIJA

Utvrđivanje efekta etarskih ulja je vršeno merenjem koncentracije proteina oslobođenih nakon tretmana *A. baumannii* ćelija različitim koncentracijama etarskih ulja. Koncentracija oslobođenih proteina određena je metodom opisanom od strane Bradford (1976). Ova metoda se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju koncentracije proteina, merenjem apsorbance na 595 nm u prisustvu Bradfordovog reagensa*.

U mikrotitar ploču je dodat uzorak (supernatant ćelija tretiranih različitim koncentracijama etarskih ulja) i Bradford-ov reagens u odnosu 1:4 (v/v) u ukupnoj zapremini 250 μ L. Apsorbanca je očitavana nakon 5 minuta od dodavanja reagensa (boja je postojana 2-30 minuta). Koncentracija proteina je izračunata pomoću standardne krive proteina, korišćenjem parametara linearne regresije. Kao standard je korišćen BSA (eng. *Bovine serum albumin*) (Sigma, USA), slepa proba za kalibraciju bila je destilovana voda, a tačke standardne krive su iznosile 8, 20, 28, 40, 48 i 60 μ g mL⁻¹ standarda proteina BSA. Standardna kriva kao i grafički prikaz oslobođenih proteina su konstruisani primenom softvera Origin 6.0. (Microcal Software, USA).

4.3.4.4. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA PROTEINSKI PROFIL *A. baumannii*

Modifikovan metod ekstrakcije ukupnih proteina korišćen je za utvrđivanje efekta koji ulja ispoljavaju na proteine bakterijske ćelije (Quan i sar., 2013). Za analizu je korišćeno četiri *A. baumannii* izolata, odabrana prema kriterijumu osetljivosti na etarska ulja. Soj Aba-4914 je bio rezistentniji, a Aba-4803 osetljiviji na etarsko ulje *M. communis*, dok je na etarsko ulje *E. camaldulensis* soj Aba-4156 bio rezistentniji, a Aba-8833 osetljiviji. Bakterijske kulture u eksponencijalnoj fazi rasta tretirane su etarskim uljima tako što su dve serije ćelija u logaritamskoj fazi rasta ostale netretirane (I i II serija), a druge dve serije su tretirane etarskim uljima vrsta *M. communis* i *E. camadulensis* u koncentraciji 1/4×MIC i 1/8×MIC (III i IV serija). Sve četiri serije dodatno su inkubirane u termostatu 3 h na 37 °C i potom centrifugirane na 3000 \times g u toku 20 minuta na temperaturi od 4 °C. Supernatant je pažljivo odliven, a talog II, III i IV serije je resuspendovan u 100 μ L SDS redukujućeg pufera za uzorke** i zagrevani 10 minuta na 100 °C. Ove tri serije predstavljaju ukupne proteine *A. baumannii* ćelija, gde su u seriji II ukupni proteini netretiranih ćelija, u seriji III ukupni proteini nakon tretmana etarskim uljima u koncentraciji 1/4×MIC, dok su u IV seriji ukupni proteini nakon tretmana ćelija etarskim uljima u koncentraciji 1/8×MIC. Talog I serije ćelija je resuspendovan u 100 μ l Tris-saharoza-EDTA (TSE) pufera***, inkubiran 30 minuta na ledu

* Comassie brilliant G 0,50 g L⁻¹, metanol 235 mL L⁻¹, 85 % fosforna kiselina 500 mL L⁻¹.

** Tris-HCl pH 7.0 60 mM, SDS 2 %, glicerol 1,32 M, bromfenol plavo 0,01 %, 2-merkaptetanol 1,00 %.

*** Tris-HCl 200 mM, pH 8.0, saharoza 500 mM, EDTA 1 mM, 4 % koktel inhibitora proteaza.

i potom iscentrifugiran na 1600 ×g u periodu od 30 minuta na temperaturi 4 °C. Dobijeni supernatant I serije ćelija sadrži periplazmatske proteine omotača. Ekstrahovani proteini su čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

Ekstrahovani proteini (ukupni i periplazmatski) su razdvojeni jednodimenzionalnom SDS-PAGE elektorforezom na 12.5 % razdvajajućem gelu i 4.0 % koncentrujućem gelu, pri naponu struje od 200 V. Pored uzoraka na gelovima je razdvojen i proteinski marker pomoću kog je određena molekulska masa proteina u uzorku. Bojenje gela je vršeno upotrebom EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma, USA) prema preporuci proizvođača. Gelovi su fotografisani kamerom Cannon EOS 100D. Molekulska masa proteina je utvrđena pomoću standardne krive konstruisane u programu Origin 6.0. (Microcal Software, 1991-1999).

4.3.4.5. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA OSLOBAĐANJE UGLJENIH HIDRATA IZ ĆELIJA

Određivanje efekta delovanja etarskih ulja na bakterijske ćelije vršeno je praćenjem povećanja sadržaja ugljenih hidrata u supernatantu metodom fenol-sumporne kiseline u mikrotitar ploči (Masuko i sar., 2005). U mikrotitar ploču je alikvotiran uzorak (supernatant ćelija tretiranih različitim koncentracijama etarskih ulja) svakog tretmana i potom dodata koncentrovana sumporna kiselina i 5 % vodenog rastvora fenola (5:15:3, v/v/v), a finalna zapremina u svakom otvoru je iznosila 230 μL. Mikrotitar ploča je inkubirana 5 minuta na 90 °C u vodenom kupatilu, a potom još 5 minuta na 20 °C, takođe u vodenom kupatilu. Sadržaji bunarčića ploče su prebačeni u novu mikrotitar ploču i optička gustina je merena na 490 nm na čitaču mikrotitar ploča MultiscanGo (Thermo Scinetific, Finland). Koncentracija ugljenih hidrata je izračunata pomoću standardne krive monosaharida konstruisane primenom softvera Origin 6.0. (Microcal Software, USA) i korišćenjem parametara linearne regresije. Kao standard korišćen je rastvor glukoze, a tačke standardne krive su iznosile 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1,0 mg mL⁻¹. Grafički prikaz oslobođenih ugljenih hidrata je takođe konstruisan primenom softvera Origin 6.0. (Microcal Software, USA).

4.3.4.6. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA OSLOBAĐANJE LIPIDA IZ ĆELIJA

Određivanje efekta delovanja etarskih ulja na bakterijske ćelije vršeno je i praćenjem povećanja sadržaja lipida ekstracelularno, tj. u prethodno pripremljenom supernatantu, modifikovanom metodom sumporna kiselina-fosforna kiselina-vanilin u mikrotitar ploči (van Handel, 1985). Zagrevanjem lipida sa koncentrovanom sumpornom kiselinom, a zatim tretiranjem fosfornom kiselinom i vanilinom obrazuje se ružičasto-crveno jedinjenje, čiji je intenzitet boje proporcionalan koncentraciji lipida i meri se spektrofotometrijski u području 510 i 550 nm.

U mikrotitar ploču je alikvotiran uzorak (supernatant ćelija tretiranih različitim koncentracijama etarskih ulja) svakog tretmana i potom je dodata koncentrovana sumporna

kiselina (1:4, v/v) tako da je finalna zapremina u bunarčićima iznosila 250 μL . Mikrotitar ploča je inkubirana 10 minuta na 90 °C u vodenom kupatilu, a potom još 10 minuta u hladnoj vodi. U novu mikrotitar ploču je prebačen uzorak kuvan sa sumpornom kiselinom i potom je dodat reagens za lipide* u odnosu 1:4 (v/v) a finalana zapremina je takođe iznosila 250 μL . Ploča je inkubirana 30 minuta, a apsorbancija je merena na 530 nm na čitaču mikrotitar ploča MultiscanGo (Thermo Scientific, Finland). Koncentracija ugljenih hidrata je izračunata pomoću standardne krive lipida, korićenjem parametara linearne regresije u softveru Origin 6.0. (Microcal Software, USA). Kao standard korićen je rastvor holesterola, a tačke standardne krive su iznosile 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1,0 mg mL^{-1} . Koncentracije lipida su predstavljene grafički primenom softvera Origin 6.0. (Microcal Software, USA).

* Vanilin 2 g, 85 % fosforna kiselina 728 mL, dopuniti destilovanom vodom do 1 L.

4.4. EFEKAT KOMBINACIJE ANTIMIKROBNIH AGENASA NA *A. baumannii*

Određivanje efekta kombinacije antimikrobnih agenasa koji su ispoljili bakteriostatski i baktericidni efekat na multiplo rezistentne *A. baumannii* izolate vršeno je primenom modifikovane metode za utvrđivanje sinergističkih interakcija (NCCLS, 2003; Wagner i Ulrich-Merzenich, 2009). Ispitivan je efekat kombinacije različitih vrsta antimikrobnih agenasa i to: kombinacije etarskih ulja i antibiotika, kombinacije komponenti etarskih ulja i antibiotika, kombinacije komponenti etarskih ulja, kao i kombinacije komponenti biljnih ekstrakata. Detektovane sinergističke kombinacije konvencionalnih i prirodnih antimikrobnih agenasa potvrdno su testirane *time kill* metodom (CLSI, 2007; Verma, 2007), radi praćenja njihovog efekta na inhibiciju bakterijskog rasta u toku vremena.

4.4.1. UTVRĐIVANJE EFEKTA KOMBINACIJE RAZLIČITIH TIPOVA ANTIMIKROBNIH AGENASA

Antimikrobna aktivnost kombinacija antimikrobnih agenasa utvrđena je modifikovanom dvodimenzionalnom metodom razređenja u mikrotitar ploči (eng. *checkerboard method*) (NCCLS, 2003; Wagner i Ulrich-Merzenich, 2009).

Ispitivana je interakcija između konvencionalnih i prirodnih antimikrobnih agenasa, tj. antibiotika i etarskih ulja. U ovom testu korišćeni su antibiotici tri različite klase, gde je iz klase lipopeptida korišćen polimiksin B, iz klase fluorohinolona ciprofloksacin, a iz klase aminoglikozida gentamicin. Etarska ulja su odabrana na osnovu kriterijuma ostvarene anti-*A. baumannii* aktivnosti. Testirano je ukupno četiri etarska ulja, dva etarska ulja vrste *M. communis* sa lokaliteta Herceg Novi i Kotor i dva etarska ulja vrste *E. camaldulensis* sa lokaliteta Herceg Novi i Bar. Za utvrđivanje efekta kombinacije odabranih konvencionalnih i prirodnih agenasa osim referentnog soja ATCC 19606, korišćena su još tri multiplo rezistentna izolata iz rana (Aba-4914, Aba-5055 i Aba-6673) odabrana na osnovu detektovane rezistencije na pomenute antibiotike. Kombinacije antimikrobnih agenasa (antibiotika i etarskih ulja) su pravljene tako što je u bunarčice mikrotitar polože dodat svaki od ispitivanih antimikrobnih agensa, pri čemu su se finalne koncentracije antibiotika kretale od $1/32 \times \text{MIC}$ do $4 \times \text{MIC}$ i opadale su verikalno u mikrotitar ploči, dok su se finalne koncentracije etarskih ulja kretale od $1/32 \times \text{MIC}$ do $1 \times \text{MIC}$ i opadale su horizontalno u mikrotitar ploči.

Efekat kombinacije antibiotika i bioaktivnih komponenti etarskih ulja, za koje su prethodno određene MIC i MBC vrednosti, je takođe ispitivan. Bioaktivne komponente timol, karvakrol i eugenol su odabrane na osnovu kriterijuma njihove utvrđene anti-*A. baumannii* aktivnosti kada su primenjeni pojedinačno. Za utvrđivanje efekta kombinacije antibiotika (korišćenih u prethodnom eksperimentu) i bioaktivnih komponenti etarskih ulja korišćena su

dva *A. baumannii* soja, referentni soj ATCC 19606 i multiplo rezistentni izolat iz rane Aba-4914. Eksperimenti su izvođeni tako što je u svaki bunarčić mikrotitar polože dodata odogovarajuća koncentracija svakog od ispitivanih antimikrobnih agensa, a finalne koncentracije antibiotika su se kretale od $1/128 \times \text{MIC}$ do $1 \times \text{MIC}$ i opadale su verikalno u mikrotitar ploči, dok su se finalne koncentracije bioaktivnih komponenti etarskih ulja kretale od $1/32 \times \text{MIC}$ do $1 \times \text{MIC}$ i opadale su horizontalno u mikrotitar ploči.

Osim prethodnih kombinacija agenasa, vršeno je i utvrđivanje efekata međusobnog kombinovanja bioaktivnih komponenti etarskih ulja. Bioaktivne komponente etarskih ulja odabrane su na osnovu kriterijuma utvrđene antimikrobne efikasnosti svake od komponenti kada je primenjena pojedinačno, a ispitani su timol, karvakrol, eugenol i sabinen. Efekat binarnih kombinacija bioaktivnih komponenti etarskih ulja je utvrđen na istim sojevima kao i u prethodnom testu (referentni soj ATCC 19606 i multiplo rezistentni soj Aba-4914). Finalne koncentracije prve bioaktivne komponente kretale su se od $1/128 \times \text{MIC}$ do $1 \times \text{MIC}$, a koncentracije druge bioaktivne komponente kretale su se od $1/32 \times \text{MIC}$ do $1 \times \text{MIC}$.

Na osnovu testiranih koncentracija agenasa u kombinaciji, za kombinacije etarskih ulja i antibiotika bila je moguća detekcija svih tipova interakcija (od sinergizma do antagonizma), dok su za ostale kombinacije antimikrobnih agenasa detektovani svi tipovi interakcija osim antagonističkih, koji nisu bili od interesa u ovom ispitivanju. Nakon pripreme različitih kombinacija antimikrobnih agenasa u mikrotitar pločama, pripremljene su i dodate bakterijske suspenzije testiranih sojeva na isti način kao i u testovima za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pojedinačnih agenasa, tako da je finalni odnos komponenti (antimikrobni agens sa rastvaračem DMSO : sterilna dH_2O : inokulisana dvostruko koncentrovana Mueller Hinton podloga) u svakom bunarčiću mikrotitar ploče bio 1:1:2 (v/v/v). Mikrotitar ploče su takođe inkubirane preko noći na 37°C , a rezultati su očitavani na već opisan način uz dodatak TTC-a. Najmanja koncentracija agenasa u kombinaciji potrebna da spreči pojavu crvene boje formazana smatrana je vrednošću MIC. Dobijene MIC vrednosti testiranih kombinacija su korišćene za određivanja FIC indeksa prema formuli i interpretaciju tipa interakcije između antimikrobnih agenasa.

Interakcije između antimikrobnih agenasa u kombinaciji određene su nakon određivanja MIC vrednosti izračunavanjem indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (FICI) za svaku kombinaciju antimikrobnih agenasa prema sledećoj formuli:

$$\text{FIC antimikrobnog agensa A} = \text{MIC agensa A u kombinaciji} / \text{MIC samog agensa A}$$

$$\text{FIC antimikrobnog agensa B} = \text{MIC agensa B u kombinaciji} / \text{MIC samog agensa B}$$

$$\text{FICI (FIC indeks)} = \text{FIC agensa A} + \text{FIC agensa B}$$

Dobijene vrednosti FIC indeksa su interpretirane na sledeći način:

- Sinergistički efekat agenasa $\text{FICI} \leq 0,5$,
- Aditivan efekat agenasa $0,5 < \text{FICI} \leq 1,0$,

- Indiferentan efekat agenasa $1,0 < FICI \leq 4,0$,
- Antagonistički efekat agenasa $FICI > 4,0$, (Mulyaningsih i sar., 2010).

Svi eksperimenti su izvedeni u najmanje dva nezavisna ponavljanja, a izračunati FIC indeksi su prikazani kao srednja vrednost sa odgovarajućom standardnom devijacijom. Kombinacija FIC vrednosti antimikrobnih agenasa je prikazana grafički izobologramima (Berenbaum, 1989) konstruisanim primenom programa KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software, USA).

Efekat kombinacije bioaktivnih komponenti ekstrakata međusobno je ispitivan modifikovanom metodom za određivanje antimikrobne aktivnosti pojedinačnih komponenti ekstrakata, tako što su napravljene kombinacije svake dve bioaktivne komponente u odnosu 1:1 (v/v). Ova metoda je korišćena zbog visokih MIC vrednosti ($>256 \mu\text{g mL}^{-1}$) i slabe antibakterijske efiksnosti komponenti biljnih ekstrakata. Od svake kombinacije napravljena su dvostruka razređenja tako da su finalne koncentracije bioaktivnih komponenti varirale od 16 do $128 \mu\text{g mL}^{-1}$. Bakterijske suspenzije referentnog soja ATCC 19606 su pripremljene na ranije opisan način, a odnos komponenti u svakom bunarčiću ploče je 1:1:2 (v/v/v). Inkubacija, očitavanje i predstavljanje rezultata je vršeno kao i prilikom određivanja antimikrobne aktivnosti pojedinačnih bioaktivnih komponenti biljnih ekstrakata. Eksperiment je rađen u najmanje dva nezavisna ponavljanja.

4.4.2. ISPITIVANJE KINETIKE INHIBICIJE RASTA *A. baumannii* KOMBINOVANJEM ETARSKIH ULJA I POLIMIKSINA B

Efekat kombinacije subinhibitornih koncentracija odabranih etarskih ulja (*M. communis* i *E. caladulensis* sa lokaliteta Herceg Novi) i konvencionalnog antibiotika (polimiksin B) u toku vremena ispitan je na dva *A. baumannii* soja (referentni soj ATCC 19606 i multiplo rezistentni soj Aba-4914) metodom *time kill* krive (CLSI, 2007; Verma, 2007). Ovaj test je rađen kao potvrda detektovanih sinergističkih interakcija među konvencionalnim i prirodnim antimikrobnim agensima. Promena u brojnosti bakterijskih ćelija tokom perioda inkubacije praćena je u četiri epruvete paralelno. Sadržaj epruveta sa podlogom Mueller Hinton bujon (HiMedia, Indija) bio je sledeći: (I) samo bakterija ($1 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$); (II) bakterija i subinhibitorna koncentracija antibiotika koji je pokazao sinergistički efekat u kombinaciji sa etarskim uljem; (III) bakterija i subinhibitorna koncentracija etarskog ulja koje je pokazalo sinergistički efekat u kombinaciji sa antibiotikom; i (IV) bakterija i subinhibitorne koncentracije antibiotika i etarskog ulja. Subinhibitorne koncentracije za polimiksin B su iznosile $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ za soj Aba-4914, odnosno $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ za ATCC 19606, dok su subinhibitorne koncentracije etarskog ulja *M. communis* iznosile $1 \mu\text{L mL}^{-1}$, odnosno za *E. camaldulensis* $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$, za oba testirana soja. Finalna zapremina svake epruvete, tj. svakog tretmana iznosila je 10 mL. Epruvete su inkubirane na 37°C u toku 24 h, a brojnost bakterija je određivana nakon 0, 3, 6, 9, 12, 15 i 24 h inkubacije zasejavanjem odgovarajućeg

razređenja na podlogu Mueller Hinton agar (HiMedia, Indija) metodom razmazivanja (granica detekcije brojnosti bakterija je bila 10^2 CFU mL⁻¹). Ploče su inkubirane na 37 °C preko noći, nakon čega su prebrojavane bakterijske kolonije. Eksperiment je ponavljen najmanje dva puta, a rezultati eksperimenta su izraženi kao srednja vrednost dekadnog logaritma broja bakterija sa odgovarajućom standardnom devijacijom (srednja vrednost ± standardna devijacija) i prikazani su grafički primenom programa KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software, USA).

Interakcija je smatrana sinergističkom i efikasnom protiv *A. baumannii* izolata ukoliko je početna brojnost bakterija nakon 24 h inkubacije, primenom kombinacije etarskog ulja i antibiotika, smanjena za ≥ 2 log u poređenju sa efikasnijim agensom kada je primenjen samostalno (etarsko ulje ili antibiotik) (Knezevic i sar., 2013).

5. REZULTATI

Poglavlje obuhvata pregled rezultata izolacije i idnetifikacije bakterijskih sojeva potrebnih za formiranje kolekcije *A. baumannii* izolata, zatim njihove fenotipske i genotipske karakteristike, kao i efekat nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa (etarskih ulja, biljnih ekstrakata i njihovih bioaktivnih komponenti) pojedinačno i u kombinaciji na sojeve iz kolekcije kultura *A. baumannii*.

5.1. KOLEKCIJA *A. baumannii* IZOLATA

Sojevi kolekcije kultura genomske vrste *Acinetobacter baumannii* su nakon izolacije podvrgnuti identifikaciji i detaljnoj karakterizaciji. Formirana kolekcija je deponovana u okviru kolekcije bakterijskih kultura Katedre za mikrobiologiju, Departmana za biologiju i ekologiju PMF UNS.

5.1.1. REZULTATI IZOLACIJE

Izolacija sojeva genomske vrste *Acinetobacter baumannii* je vršena iz više različitih tipova uzoraka i primenom različitih metoda, od kojih su se neke pokazale kao pogodnije u odnosu na druge.

Direktnim zasejavanjem originalnih uzoraka na Herella agar utvrđivano je prisustvo i broj ljubičastih (nefermentišućih) i žutih (fermentišućih) kolonija (tabela 5.1). Iz tabele 5.1 se vidi da su kolonije karakteristične za ispitivanu vrstu detektovane u svim uzorcima, a brojnost detektovana u tri uzorka (M, DTD i D-Z) bila je izuzetno visoka.

U 1 mL svih uzoraka detektovano je potencijalno prisustvo vrsta roda *Acinetobacter*, jer su u svim uzorcima detektovane ljubičaste, nefermentišuće kolonije. U sva tri uzorka podzemnih ispitivanih voda (P1, P2 i P3) uočena je mala brojnost kako fermentišućih kolonija, tako i nefermentišućih, koje su potencijalni pripadnici roda *Acinetobacter*.

Tabela 5.1. Prosečan broj žutih i ljubičastih kolonija na Herella agaru nakon zasejavanja originalnih uzoraka

Boja kolonija	Uzorc										
	M	SR	BJ	DTD	D-N	D-Z	DP	DB	P1	P2	P3
Žuta	P*	23	18	P	844	P	276	81	3	40	4
Ljubičasta	P	10	43	P	84	P	152	63	1	8	2

*P- prerasle kolonije na ploči

Nakon inkubacije 9 podloga za obogaćenje, zasejanih originalnim uzorcima, prisustvo rasta detektovano je vizuelno i primenom kolorimetra. Što su vrednosti transmisije svetlosti bile manje, bakterijski rast je bio veći, i obrnuto. Detektovane vrednosti transmisije svetlosti

kretale su se od 54 % do 99 % (prilog 9.5). Detektovan je pad intenziteta transmisije svetlosti prilikom produžene inkubacije. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h vrednost transmisije svetlosti se kretala od 67 do 99 %, a nakon inkubacije od 48 h 54 do 89 %. Podloga sa najvišom zabeženom transmisijom svetlosti je podloga sa etanolom (85-98 % nakon 24 h, odnosno 63-98 % nakon 48 h), kao i podloga sa leucinom (84-97 % nakon 24 h, odnosno 76-89 % nakon 48 h). Najniža transmisija svetlosti detektovana je na podlozi sa histidinom nakon 24 h (60-86 %), odnosno na podlozi sa triptofanom (54-85 %) nakon 48 h. Uzorci podzemnih voda (P1, P2 i P3) su imali najvišu transmisiju svetlosti (87-99 % nakon 24 h, 80-89 % nakon 48 h), dok su uzorci D-N i D-Z imali najnižu (67-97 % nakon 24 h, 54-86 % nakon 48 h).

5.1.2. REZULTATI IDENTIFIKACIJE

Nakon izolacije iz podloga za obogaćenje, izolati dobijeni posle 24 h, odnosno 48 h inkubacije podvrgnuti su testovima za identifikaciju. Obogaćenjem 11 uzoraka poreklom iz prirodne sredine na podlogama sa 9 različitih supstrata, izolovano je i identifikovano ukupno 66 sojeva iz osam različitih uzoraka, dok iz preostala tri izolacija nije bila uspešna. U tabeli 5.2 prikazani su rezultati preliminarnih i potvrđnih testova, odnosno dat je prikaz podloga za obogaćenje koje su se pokazale uspešne u ove svrhe.

Tabela 5.2. Rezultati izolacije *Acinetobacter baumannii* nakon inkubacije podloga za obogaćenje tokom 24 h odnosno 48 h, dobijeni upotrebom preliminarnih i potvrđnih testova

Vrsta testa	Uzorci											
	M	SR	BJ	DTD	D – N	D – Z	DP	DB	P1	P2	P3	
Preliminarni testovi	24 h	Ac	Ac, Al, E, Ph, H, Le, T	T	T	Ac, Al, Ph, H, P	P, T	E, Ph	T	/	/	/
	48 h	Ac, Al, H	P, T	Ph	/	Ac, Al, Le	Ac, Al, Ph, H, T	Ph, P	Al, Ph	/	/	/
Potvrđni testovi	24 h	Ac*	Ac*, Al, E, Ph, H, Le, T*	/	T*	Ac*, Al, Ph, H	P, T	E, Ph	/	/	/	/
	48 h	Ac, Al, H	T	/	/	Ac, Le	Ac*, Al, Ph, H, T	Ph*	Ph*	/	/	/

Ac - Na-acetat, Al - β -alanin, E - etanol, Ph - L-fenilalanin, H - L-histidin, La - Na-L-laktat, Le - L-leucin, P - Na-piruvat, T - L-tirozin; * sojevi odabrani za dalje analize; / - izolacija nije bila uspešna

U slučaju kada su potvrđni testovi dali očekivane rezultate, vršena je identifikacija sojeva poreklom iz različitih uzoraka prirodne sredine (tabela 5.3). Osim sojeva izolovanih iz prirodne sredine, izolati iz humanog patološkog materijala su takođe podvrgnuti identifikaciji

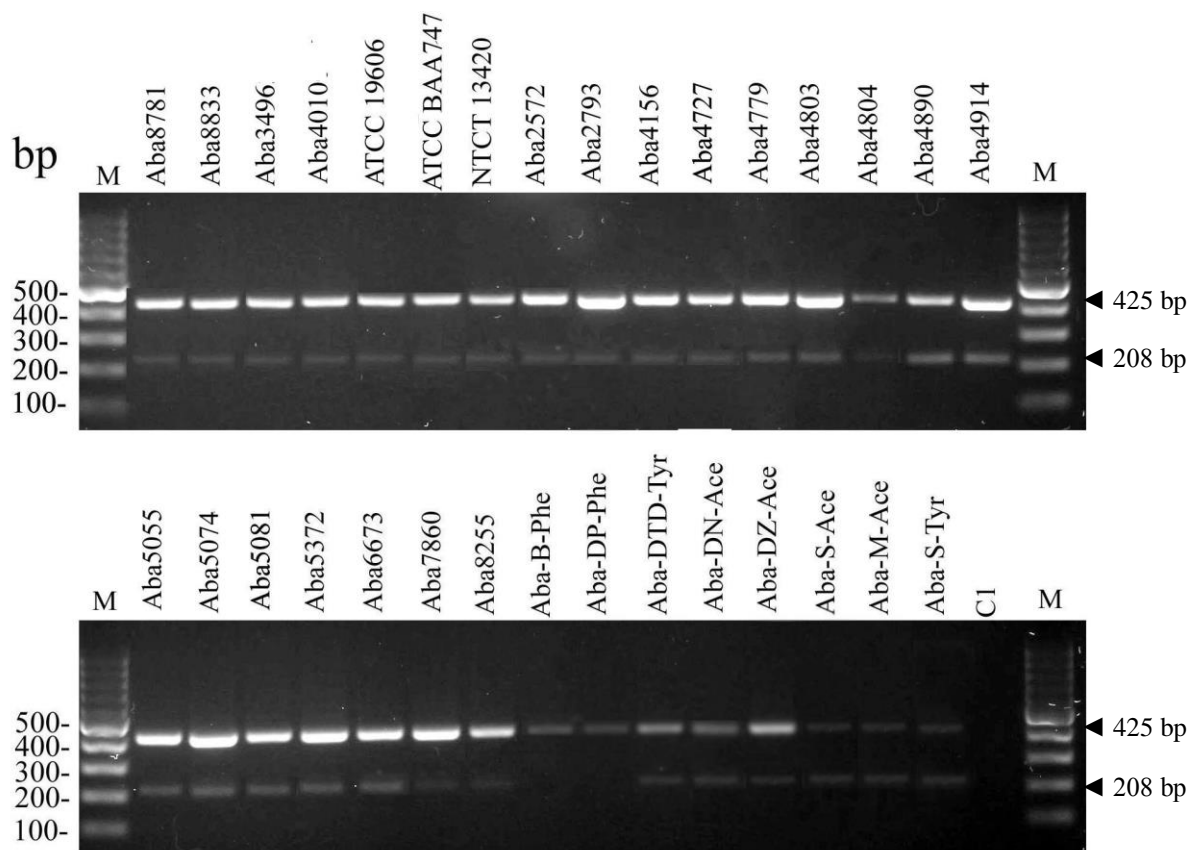
(preliminarnim i potvrdnim testovima). U tabeli 5.3 je dat pregled svih sojeva korišćenih za potvrdnu identifikaciju molekularno-gentičkim metodama.

Tabela 5.3. Izolati genovrste *Acinetobacter baumannii*

Oznaka soja	Poreklo soja	Lokalitet izolacije	Grupe
ATCC BAA747	patološki material	Referentni soj	Referentni sojevi
ATCC 19606	urinarna infekcija	Referentni soj	
NCTC 13423	patološki material	T strain (UK3) OXA-51-like	
Aba-M-Ace	površinska voda	Zapdana Morava, Kruševac	Sojevi prirodne sredine
Aba-S-Ace	površinska voda	Pritoka Zapadne Morave, Kruševac	
Aba-S-Tyr	površinska voda	Pritoka Zapadne Morave, Kruševac	
Aba-B-Phe	površinska voda	Begečka Jama, Begeč	
Aba-DTD-Tyr	površinska voda	Kanal Dunav-Tisa-Dunav, Novi Sad	
Aba-DN-Ace	površinska voda	Dunav, pre izliva kanalizacije, Novi Sad	
Aba-DZ-Ace	površinska voda	Dunav, posle izliva kanalizacije, Novi Sad	
Aba-DP-Phe	površinska voda	Veštačka akumulacija Dunavskog parka, Novi Sad	
Aba-4156	Bolnički izolat	infekcija rane	Sojevi humanog patološkog materijala
Aba-4727	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-4803	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-4779	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-5074	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-5055	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-5372	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-4914	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-4890	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-2572	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-2793	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-6673	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-7860	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-4804	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-5081	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-3496	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-4010	Bolnički izolat	infekcija rane	
Aba-8255	Ambulantni izolat	infekcija rane	
Aba-8781	Ambulantni izolat	infekcija rane	
Aba-8833	Ambulantni izolat	infekcija rane	

Nakon što su izolati identifikovani biohemijskim metodama, identifikacija odabranih sojeva izvršena je primenom VITEK2, što je potvrdilo da testirani izolati pripadaju *A. calcoaceticus-baumannii* kompleksu. Premenom molekularno genetičkih metoda je

omogućena identifikacija izolata do nivoa genovrste (slika 5.1). Svi izolati su dali oba očekivana PCR produkta odgovarajuće veličine, sa izuzetkom Aba-B-Phe i Aba-DP-Phe, koji su isključeni iz daljih istraživanja, osim ako to nije posebno naglašeno. Prema rezultatima ova dva soja su pripadnici Acb kompleksa, ali ne i genomske vrste *A. baumannii*. Ovi izolati su kao pripadnici Acb kompleksa poreklom iz prirodne sredine korišćeni u svim testovima karakterizacije, odnosno određivanja fenotipskih i genotipskih osobina izolata, osim u RAPD-PCR analizi *A. baumannii* izolata.



Slika 5.1. Identifikacija *A. baumannii* izolata molekularno-genetičkim metodama (C1-negativna kontrola, M-marker, 425 bp-fragment visoko konzervisanog regiona *recA* gena roda *Acinetobacter*, 208 bp-fragment specifičnog regiona *ITS* gena *A. baumannii*)

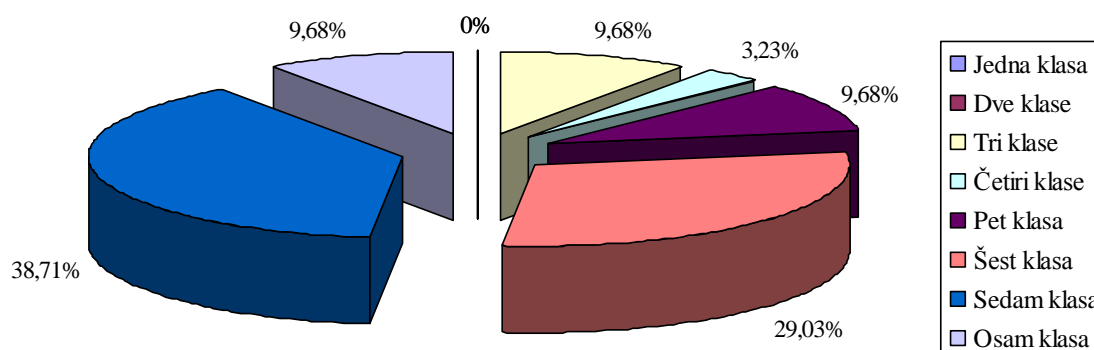
5.1.3. REZULTATI FENOTIPIZACIJE

Karakterizacija sojeva oformljne kolekcije genomske vrste *Acinetobacter baumannii* je ostvarena analizom velikog broja fenotipskih karakteristika kao što su osetljivost izolata na konvencionalne antimikrobne agense, zatim brzina rasta na podlogama sa različitim izvorima ugljenika, njihov proteinski profil, kao i karakteristike važne u procesu formiranja biofilma.

5.1.3.1. OSETLJIVOST IZOLATA NA KONVENCIONALNE ANTIMIKROBNE AGENSE

Osetljivost *A. baumannii* izolata i dva izolata Acb kompleksa na konvencionalne antimikrobne agense je prikazana u tabeli 5.4. Dobijene MIC i MBC vednosti potvrđuju činjenicu da su sojevi u velikoj meri rezistentni na mnoge ispitivane antibiotike. Naime, svi ispitivani izolati bili su rezistentni na ceftriakson i hloramfenikol, a visok stepen rezistencije ispoljili su i na tetraciklin, kanamicin i tirmetoprim/sulfametoksazol (86,2 %), gentamicin (72,4 %), ciprofloksacin i tobramicin (69,0 %), kao i netilmicin (51,7 %). Od ispitivanih konvencionalnih antibiotika kao nešto efikasniji pokazali su se imipenem na koji je bilo rezistentno 41,4 % sojeva i amikacin sa 37,9 % rezistentnih sojeva. Najefikasniji konvencionalni agens bio je polimiksin B, na koji je bilo rezistentno 22,6 % sojeva. U tabeli 5.5 prikazani su i rezultati osetljivosti *A. baumannii* izolata iz humanog patološkog materijala na imipenem, prema kojima su 2 referentna soja i 8 izolata bili osetljivi, dok je preostalih deset izolata bilo rezistentno i na ovaj antibiotik.

Na osnovu rezultata može se primetiti da nisu svi antibiotici ispoljili uticaj na rast bakterijske vrste *A. baumannii*, tako da je detektovan različit stepen rezistencije sojeva (grafikon 5.1; prilog 9.6), a svi izolati su ispoljili rezistenciju na tri ili više konvencionalnih antibiotika. Jedan izolat Aba-4156 je bio rezistentan na sve ispitivane antibiotike, a ukupno četiri izolata (Aba-4890, Aba-4914, Aba-5055 i Aba-DN-Ace) bilo je rezistentno čak na jedanaest antibiotika. Na 10 od 12 ispitivanih antibiotika bilo je rezistentno šest izolata (5 iz rana: Aba-4727, Aba-4803, Aba-4804, Aba-5081, Aba-7860 i 1 iz prirodne sredine: Aba-S-Ace), a isto toliko izolata je ispoljilo rezistenciju na 9 ispitivanih konvencionalnih antibiotika (4 izolata iz rana i 2 iz prirodne sredine). Po tri *A. baumannii* izolata bilo je rezistentno na 8 i 7 antibiotika, a 4 izolata iz rana (Aba-2793, Aba-5372, Aba-8255 i Aba-8781) bilo je rezistentno na 6 od 12 testiranih antibiotika. Referentni sojevi su bili rezistentni na svega tri antibiotika, dok ni jedan soj nije bio rezistentan na 5, 4, 2 ili 1 antibiotik. Statistički značajna razlika u stepenu rezistencije izolata iz rana i izolata iz prirodne sredine nije potvrđena ($P=0,36$). *Acinetobacter baumannii* sojevi i dva soja Acb kompleksa iz kolekcije kultura mogu se smatrati multiplo rezistentnim (prilog 9.6).



Grafikon 5.1. Multipla rezistencija *A. baumannii* sojeva i dva soja Acb kompleksa (n=31)

Tabela 5.4. MIC i MBC vrednosti konvencionalnih antimikrobnih agenasa protiv *A. baumannii* izolata i dva izolata Acb kompleksa

<i>A. baumannii</i> izolati	Konvencionalni antimikrobni agensi																
	Amikacin		Ceftriakson		Ciprofloksacin		Hloramfenikol		Gentamicin		Kanamicin		Polimiksin B		Tetraciklin		
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	
Bolnički izolati	Aba-2572	1,41*	64	>256	>256	0,71*	5,66	128	256	22,63	90,51	>256	>256	4	4	128	>256
	Aba-2793	2*	4	>256	>256	0,25*	0,35	45,25	256	256	256	>256	>256	0,71*	1	22,63	64
	Aba-4156	>256	>256	>256	>256	45,25	256	64	90,51	>256	>256	>256	>256	4	4	>256	>256
	Aba-4727	8*	16	>256	>256	32	32	64	256	16	256	>256	>256	0,71*	2	>256	>256
	Aba-4779	11,31*	32	>256	>256	45,25	64	64	64	2,83*	2,83	>256	>256	1,41*	2	256	>256
	Aba-4803	22,63	32	256	256	45,25	64	256	256	64	64	>256	>256	0,71*	1	256	256
	Aba-4804	22,63	32	>256	>256	32	90,51	256	256	45,25	64	>256	>256	2	5,66	256	>256
	Aba-4890	>256	>256	>256	>256	32	64	64	>256	>256	>256	>256	>256	0,71*	1	>256	>256
	Aba-4914	22,63	>256	>256	>256	64	64	90,51	256	>256	>256	>256	>256	4	8	256	256
	Aba-5055	4*	4	>256	>256	64	128	90,51	128	16	16	>256	>256	4	16	>256	>256
	Aba-5074	16	16	>256	>256	32	45,25	64	128	>256	>256	>256	>256	0,5*	1	>256	>256
	Aba-5081	8*	16	>256	>256	45,25	64	64	64	16	45,25	>256	>256	0,71*	1	>256	>256
	Aba-5372	0,35*	1	>256	>256	0,5*	5,66	64	128	0,35*	0,35	>256	>256	0,5*	0,5	>256	>256
	Aba-6673	2,83*	4	>256	>256	45,25	64	128	128	64	64	>256	>256	0,71*	1	>256	>256
	Aba-7860	32	32	>256	>256	32	64	90,51	128	>256	>256	>256	>256	2	16	>256	>256
	Aba-3496	5,66*	16	>256	>256	16	22,63	256	>256	128	128	>256	>256	1*	1	128	128
	Aba-4010	2,83*	45,25	>256	>256	32	64	45,25	90,51	128	128	>256	>256	0,5*	11,31	8	32
	Ambulantni izolati	Aba-8255	1*	2	>256	>256	0,5*	0,5	64	64	1,41*	5,66	>256	>256	0,71*	2	>256
Aba-8781		<0,25*	<0,25	22,63	45,25	0,125*	1	64	128	0,5*	0,5	2,83*	2,83	0,5*	0,5	2*	16
Aba-8833		8*	16	16	45,25	0,125*	0,35	64	>256	0,5*	0,5	>256	>256	0,5*	0,5	0,71*	22,63
Referentni sojevi	ATTC19606	<0,25*	0,5	45,25	45,25	0,35*	0,35	64	128	16	16	4*	4	0,5*	0,5	2*	4
	ATCCBAA747	0,35*	0,35	45,25	90,51	0,35*	0,35	64	256	0,5*	0,5	2*	2	0,5*	0,5	5,66	11,31
	NCTC 13423	0,35*	0,35	22,63	45,25	0,35*	0,35	64	128	4*	16	2*	4	0,5*	0,5	2*	8
Izolati iz prirodne sredine	Aba-S-Ace	16*	32	45,25	256	4	45,25	90,51	181,02	8	45,25	128	128	2	2	90,51	181,02
	Aba-S-Tyr	32	181,02	90,51	256	16	128	90,51	>256	4*	64	256	256	1,41*	2,83	>256	>256
	Aba-DZ-Ace	64	181,02	90,51	>256	11,32	128	90,51	>256	16	45,25	22,63	>256	1*	1	256	>256
	Aba-DN-Ace	>256	>256	>256	>256	64	>256	90,51	256	>256	>256	>256	>256	2	5,66	>256	>256
	Aba-M-Ace	64	>256	181,02	>256	22,63	256	90,51	181,02	64	45,25	256	>256	2,83	4	>256	>256
Aba-DP-Phe	45,25	128	90,51	>256	5,66	128	90,51	>256	11,31	32	45,25	>256	2	4	181,02	>256	
Aba-DTD-Tyr	11,3*	256	16	256	5,66	128	90,51	>256	5,66	22,63	22,63	>256	1*	2,83	64	181,02	

Aba-B-Phe	11,3*	8	22,63	32	0,25*	5,66	90,51	181,02	0,5*	4	0,71*	4	2	2,83	90,51	>256
<i>E. coli</i> ATCC25922	2	-	0,25	-	<0,06	-	4	-	0,5	-	2	-	1	-	1	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	-	<0,25	-	<0,06	-	4	-	0,25	-	2	-	0,5	-	1	-

* Sojevi osetljivi na konvencionalne antibiotike prema MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) vrednostima interpretiranim prema standardu (NCCLS, 2003; CLSI, 2007). Rezultati su predstavljeni kao geometrijska sredina tri ponavljanja.

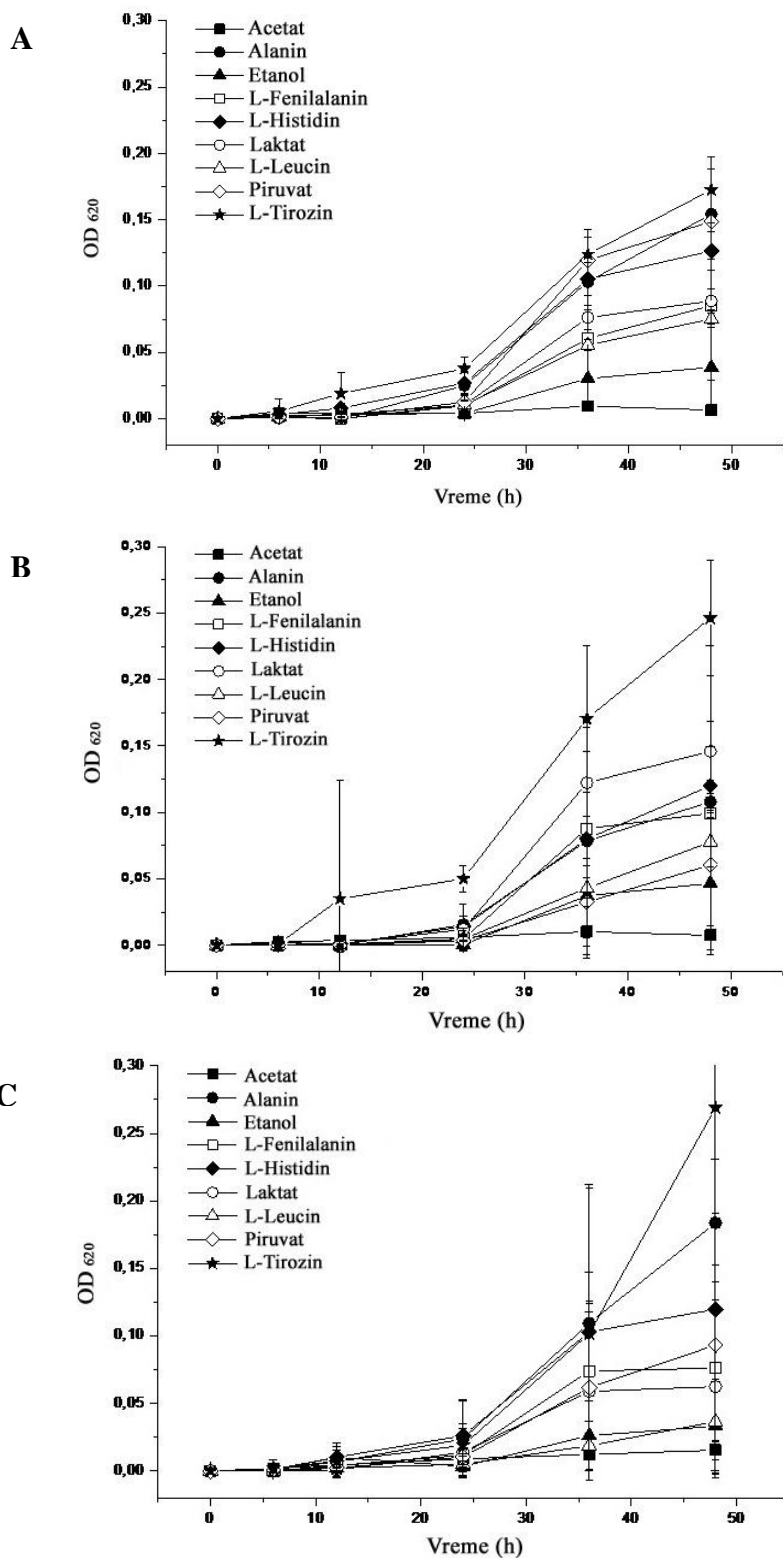
Tabela 5.5. Osetljivost *A. baumannii* izolata na imipenem, netilmicin, tobramicin i trimetoprim/sulfametoksazol

<i>A. baumannii</i> soj	Imipenem		Netilmicin		Tobramicin		Trimetoprim/ Sulfametoksazol	
	PZI (mm)	Interpretacija	PZI (mm)	Interpretacija	PZI (mm)	Interpretacija	PZI (mm)	Interpretacija
Aba-2572	25	S	0	R	14	I	0	R
Aba-2793	10	R	21,5	S	19	S	21,5	S
Aba-4156	0	R	0	R	0	R	0	R
Aba-4727	10	R	0	R	11	R	0	R
Aba-4779	0	R	0	R	11,5	R	0	R
Aba-4803	0	R	16,7	S	10,5	R	13	I
Aba-4804	16	R	20	S	11	R	12	I
Aba-4890	10	R	0	R	0	R	0	R
Aba-4914	26	S	9,5	R	11,3	R	0	R
Aba-5055	8	R	0	R	11	R	0	R
Aba-5074	9	R	18	S	17,5	S	0	R
Aba-5081	8	R	0	R	10,25	R	0	R
Aba-5372	9	R	17	S	15	S	13	I
Aba-6673	29	S	0	R	9	R	0	R
Aba-7860	28	S	11,5	R	15	S	0	R
Aba-3496	25	S	16	S	14,5	I	0	R
Aba-4010	31	S	15	S	14	I	0	R
Aba-8255	32	S	15	S	14	I	12	I
Aba-8781	31	S	14,7	I	14,7	I	10	R
Aba-8833	18	I	17	S	10	R	15	I
ATTC19606	32	S	22	S	21	S	18	S
ATCCBAA747	34	S	23	S	19,5	S	17,5	S
NCTC 13423	28,5	S	19	S	18	S	0	R
Aba-S-Ace	19	S	0	R	0	R	0	R
Aba-S-Tyr	16	S	0	R	6	R	0	R
Aba-DZ-Ace	20	S	17	S	10	R	0	S
Aba-DN-Ace	24	S	0	R	6,7	R	16	R
Aba-M-Ace	22	S	17	S	15	S	13	I
Aba-DP-Phe	0	R	0	R	0	R	0	R
Aba-DTD-Tyr	22	S	16	S	15,5	S	11	I
Aba-B-Phe	0	R	0	R	0	R	0	R
<i>E. coli</i>								
ATCC25922	30	S	22	S	20	S	23	S
<i>S. aureus</i>								
ATCC 25923	32	S	23	S	22	S	25	S

* S-osetljiv, I-umereno osetljiv, R-rezistentan, PZI- prečnik zone inhicije

5.1.3.2. RAST NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJENIKA

Tri testirana *A. baumannii* izolata (ATCC 19606, ATCC BAA747 i Aba-DN-Ace) poseduju sposobnost rasta na podlogama sa različitim izvorom ugljenika (grafikon 5.2). Kao najnepogodniji izvor ugljenika za rast ove bakterije pokazao se acetat, jer je stopa rasta *A. baumannii* na ovom suspratu bila niska i nakon 48 h inkubacije. Uvećanje kinetike rasta nakon 24 h iznosilo je ~ 120 % (odnosno 1,2 puta), a nakon 48 h inkubacije svega ~140 %. Kao najpogodniji izvor ugljenika za rast sva tri soja pokazao se L-tirozin, jer je uticao na veoma izraženu stopu rasta *A. baumannii*. U periodu od 0-24 h inkubacije uvećanje stope rasta je iznosilo 1,8 puta (~180 %), dok je nakon 48 h inkubacije iznosilo približno 6,67 puta (odnosno ~667 % u proseku za sva tri soja). Alanin, piruvat i L-histidin su se takođe pokazali kao veoma pogodni izvori ugljenika za sojeve vrste *A. baumannii*. Alanin je posle tirozina uzrokovao najveći rast nakon 48 h (približno 5,67 puta; ~567 %), dok su piruvat i L-histidin izazvali sličan intenzitet rasta, gde je ukupno uvećanje rasta bilo ~500 %. Umeren intenzitet rasta *A. baumannii* na supstratima L-fenilalanin, laktat i L-leucin, gde je nakon 24 h inkubacije uvećanje brojnosti ćelija iznosilo oko 250 %, 278 % i 294 %, redom, a nakon 48 h ~370 % na prva dva supstrata, odnosno ~385 % na L-leucinu. Najsporiji rast *A. baumannii* sojeva je detektovan na supstratima acetat i etanol, gde je nakon 24 h uvećanje iznosilo ~120 % za oba supstrata, a nakon 48 h ~140 % za acetat, odnosno ~180 % za etanol.

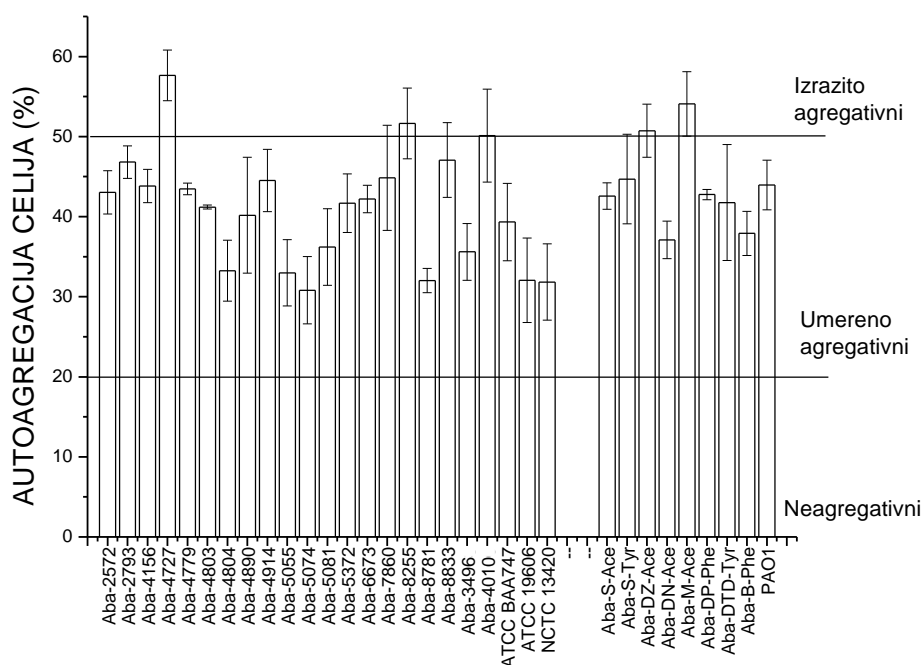


Grafikon 5.2. Kinetika rasta *A. baumannii* sojeva ATCC 19606 (A), ATCC BAA747 (B) i Aba-DN-Ace (C) na podlogama sa različitim izvorom ugljenika

5.1.3.3. FENOTIPSE KARAKTERISTIKE VAŽNE U PROCESU FORMIRANJA BIOFILMA

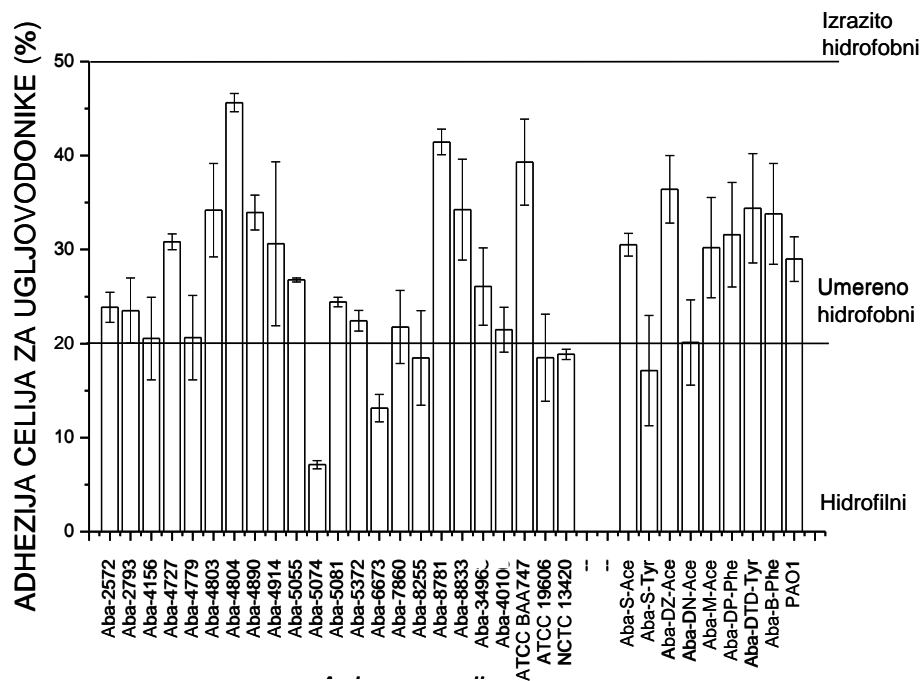
A. baumannii sojevi su posedovali većinu ispitivanih fenotipskih osobina (autoagregacija, hidrofobnost, pokretljivost pilima i produkcija lekitna) važnih za proces formiranja biofilma. Takođe, svi sojevi su u manjoj ili većoj meri posedovali sposobnost formiranja biofilma u *in vitro* uslovima na polistirenu.

Rezultati ispitivanja stepena autoagregacije ćelija *A. baumannii* izolata poreklom iz rana i prirodne sredine, kao i dva soja pripadnika Acb kompleksa, prikazani su na grafikonu 5.3. Najveći broj izolata iz rana je pokazao umeren stepen autoagregacije ćelija, koji se kretao od 30,8 do 50 %, osim za tri soja, koji su se pokazali kao izrazito autoagregativni (Aba-4727, Aba-8255 i Aba-4010). Takođe, najveći broj izolata iz prirodne sredine je pokazao umeren stepen autoagregacije, koji se kretao od 37 % do 44,7 %, osim izrazito autoagregativnih sojeva Aba-DZ-Ace (50,7 %) i Aba-M-Ace (54,1 %). Soj iz rana koji se pokazao kao najautoagregativniji u odnosu na sve testirane *A. baumannii* izolate je Aba-4727, dok se soj Aba-5074 takođe poreklom iz rana pokazao kao najmanje autoagregativan, kada se u obzir uzmu svi ispitivani sojevi. Nije utvrđena statistički značajna razlika u stepenu autoagregacije između izolata poreklom iz humanog patološkog materijala i izolata poreklom iz prirodne sredine ($P=0,78$).



Grafikon 5.3. Autoagregativnost ćelija *A. baumannii* izolata i dva izolata pripadnika Acb kompleksa

Rezultati ispitivanja stepena hidrofobnosti ćelija *A. baumannii* izolata poreklom iz rana i prirodne sredine, kao i dva soja pripadnika Acb kompleksa, prikazani su na grafikonu 5.4. Najveći broj izolata iz rana je pokazao umeren stepen hidrofobnosti, koji se kretao od 20,5 % do 45,6 %, sa izuzetkom 5 izolata koji su bili hidrofilni, a soj iz rana koji se pokazao kao najhidrofobniji je Aba-4804. Svi izolati iz prirodne sredine su pokazali umeren stepen hidrofobnosti koji se kretao od 20 % do 36,4 %, osim hidrofilnog soja Aba-S-Tyr. Soj iz prirodne sredine koji se pokazao kao najhidrofobniji je Aba-DZ-Ace. Soj Aba-5074 iz rana se pokazao kao najmanje hidrofoban (7,1 %), kada se u obzir uzmu svi ispitivani sojevi. Nije utvrđena statistički značajna razlika u stepenu hidrofobnosti između izolata poreklom iz humanog patološkog materijala i izolata poreklom iz prirodne sredine ($P=0,89$). Statistički značajna korelacija između osobina hidrofobnosti i autoagregacije nije utvrđena ($\tau = -0,01$; $P=0,93$).



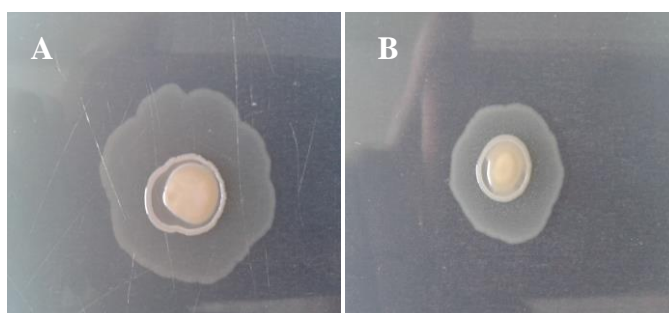
Grafikon 5.4. Hidrofobnost ćelija *A. baumannii* izolata i dva izolata pripadnika Acb kompleksa

Rezultati pokretljivosti bakterije, koja je jedna od bitnih karakteristika za određivanje potencijala formiranja biofilma, prikazani su u tabeli 5.6. Sposobnost trzajućeg kretanja, tj. pokretljivosti pomoću pila tipa IV, je uočena kod svih ispitivanih izolata (slika 5.2). Veličina zone difuznog zamućenja oko mesta inokulacije nakon 48h kod izolata iz rana je iznosila od 9,5 mm do 51,5 mm za soj Aba-4803. Veličina zone difuznog zamućenja oko mesta inokulacije nakon 48h kod izolata iz prirodne sredine je iznosila od 12 mm do 52,5 mm, kod soja Aba-DN-Ace. Najmanju zonu difuznog zamućenja kada se u obzir uzmu svi sojevi je pokazao soj Aba-4914 iz rana. Nije utvrđena statistički značajna razlika u stepenu

pokretljivosti između izolata poreklom iz humanog patološkog materijala i izolata poreklom iz prirodne sredine (P=0,059).

Tabela 5.6. Rezultati pokretljivosti ćelija *A. baumannii* izolata i dva izolata pripadnika Acb kompleksa

Poreklo izolata	Naziv izolata	Prečnik zone difuznog zamućenja (mm)
Referentni sojevi	ATCC BAA747	22,0 ± 1,4
	ATCC 19606	20,5 ± 2,1
	NCTC 13423	7,5 ± 0,7
	PAO1	26,0 ± 0,6
Izolati iz humanog patološkog materijala	Aba-2572	18,0 ± 5,7
	Aba-2793	25,5 ± 7,8
	Aba-4156	33,0 ± 8,5
	Aba-4727	20,5 ± 2,0
	Aba-4779	16,0 ± 1,4
	Aba-4803	51,5 ± 9,2
	Aba-4804	21,5 ± 9,2
	Aba-4890	23,8 ± 4,6
	Aba-4914	9,5 ± 0,7
	Aba-5055	14,5 ± 0,7
	Aba-5074	11,5 ± 2,1
	Aba-5081	19,3 ± 0,4
	Aba-5372	22,5 ± 3,5
	Aba-6673	27,8 ± 6,0
	Aba-7860	34,0 ± 8,5
	Aba-8255	21,0 ± 6,9
	Aba-8781	46,0 ± 2,8
	Aba-8833	26,8 ± 1,8
	Aba-3496	26,5 ± 0,7
	Aba-4010	16,5 ± 6,4
Izolati iz prirodne sredine	Aba-S-Ace	12,0 ± 1,4
	Aba-S-Tyr	19,0 ± 6,4
	Aba-DZ-Ace	15,0 ± 1,4
	Aba-DN-Ace	52,5 ± 15,5
	Aba-M-Ace	14,5 ± 2,1
	Aba-DP-Phe	19,8 ± 6,0
	Aba-DTD-Tyr	28,8 ± 6,0
	Aba-B-Phe	17,0 ± 1,4



Slika 5.2. Pokretljivost *A. baumannii* izolata pilima tipa IV (A) ATCC 19606 i (B) Aba-5055

Nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija između pokretljivosti pilima i autoagregacije ćelija ($\tau = -0,03$; $P = 0,82$), kao ni hidrofobnosti ćelija ($\tau = 0,10$; $P = 0,44$).

Rezultati hemaglutinacije *A. baumannii* lektina eritrocita različitih krvnih grupa prikazani su u tabeli 5.7. Jasno se može uočiti da su lektini produkovani od strane *A. baumannii* izolata, kako iz humanog patološkog materijala tako i iz prirodne sredine, kao i dva izolata Acb kompleksa, ispoljili hemaglutinaznu aktivnost prema svim ispitivanim krvnim grupama.

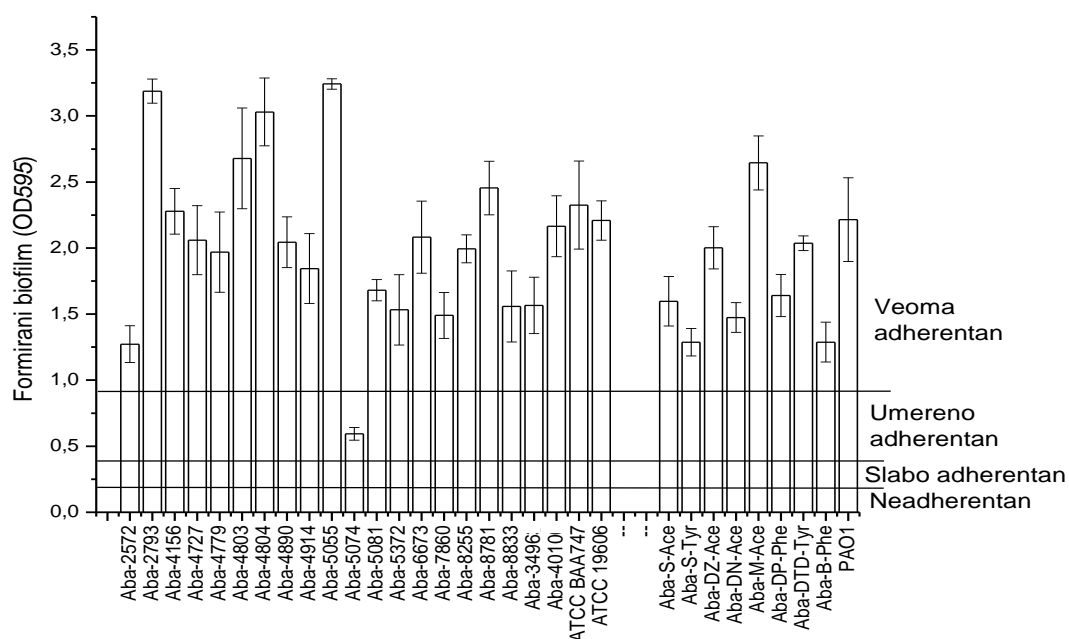
Tabela 5.7. Titar lektina i njihova specifičnost prema krvnim grupama

<i>A. baumannii</i> izolati	Titar lektina	Krvne grupe		
		O Rh+	A Rh +	B Rh+
Aba-M-Ace	1/16	+	+	+
Aba-S-Ace	1/16	+	+	+
Aba-S-Tyr	1/32	+	+	+
Aba-B-Phe	1/32	+	+	+
Aba-DTD-Tyr	1/32	+	+	+
Aba-DN-Ace	1/8	+	+	+
Aba-DZ-Ace	1/4	+	+	+
Aba-DP-Phe	1/4	+	+	+
ATCC BAA747	1/16	+	+	+
ATCC 19606	1/4	+	+	+
NCTC 13423	1/16	+	+	+
Aba-2572	1/4	+	+	+
Aba-2793	1/16	+	+	+
Aba-4156	1/16	+	+	+
Aba-4727	1/32	+	+	+
Aba-4779	1/32	+	+	+
Aba-4803	1/32	+	+	+
Aba-4804	1/64	+	+	+
Aba-4890	1/64	+	+	+
Aba-4914	1/16	+	+	+
Aba-5055	1/32	+	+	+
Aba-5074	1/32	+	+	+
Aba-5081	1/16	+	+	+
Aba-5372	1/8	+	+	+
Aba-6673	1/16	+	+	+
Aba-7860	1/32	+	+	+
Aba-8255	1/16	+	+	+
Aba-8781	1/4	+	+	+
Aba-8833	1/4	+	+	+
Aba-3496	1/4	+	+	+
Aba-4010	1/8	+	+	+
PAO-1	1/32	+	+	+

(+) prisustvo hemaglutinacije, (-) odsustvo hemaglutinacije

Rezultati semikvantifikacije produkovanih lektina od strane *A. baumannii* izolata i dva izolata Acb kompleksa prikazani su u tabeli 5.7. Titar hemaglutinacije kretao se od 1:4 do 1:64. Razređenja lektina koja su kod većine sojeva dovela do hemaglutinacije su 1:16 i 1:32, uzimajući u obzir i bolničke i sojeve iz prirodne sredine.

Titar lektina referentnih sojeva je nešto niži u odnosu na ostale izolate. Sojevi ATCC BAA474 i NCTC 13423 imaju maksimalni titar hemaglutinacije pri razređenju 1:16, dok je maksimalan titar referentnog soja ATCC 19606 1:4. Titar hemaglutinacije izolata poreklom iz humanog patološkog materijala je bio nešto veći od titra sojeva iz prirodnih sredina. Izolati iz rana Aba-4804 i Aba-4890 produkuju najviše lektina, pri čemu je titar hemaglutinacije 1:64. Najmanje lektina produkuju *A. baumannii* sojevi Aba-DN-Ace i Aba-DZ-Ace poreklom iz prirodne sredine, ali i Aba-3496, Aba-8833, Aba-8781 i Aba-2572, koji su poreklom iz humanog patološkog materijala. Na osnovu dobijenih rezultata, nije utvrđena stistički značajna razlika između stepena produkcije lektina sojeva poreklom iz humanog patološkog materijala u odnosu na izolate poreklom iz prirodne sredine ($P=0,87$). Takođe, nije utvrđena statistički značajna korelacija između stepena produkcije lektina i ostalih utvrđenih osobina testiranih sojeva – autoagregacije ($\tau = -0,05$, $P=0,68$), hidrofobnosti ($\tau = 0,02$, $P=0,86$) i pokretljivosti ($\tau = -0,03$, $P=0,81$).



Grafikon 5.5. Produkcija biofilma *A. baumannii* izolata i dva izolata Acb kompleksa na polistirenu

Stepen produkcije biofilma izolata iz rana i prirodne sredine na polistirenu je prikazan na grafikonu 5.5. Svi izolati iz rana su se pokazali kao veoma adherentni, osim soja Aba-5074, koji se pokazao kao umereno adherentan, a svi izolati iz prirodne sredine pokazali su se kao veoma adherentni. Jasno se može uočiti da je stepen produkcije biofilma kod izolata iz rana najveći kod soja Aba-5055, dok stepen produkcije biofilma kod izolata iz prirodne sredine je

najveći kod soja Aba-M-Ace. Statističkom obradom rezultata utvrđena je statistički značajna razlika u stepenu produkcije biofilma između sojeva različitog porekla ($P=0,036$).

Nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija između stepena produkcije biofilma i stepena produkcije lektina kod ispitivanih izolata ($\tau = 0,09$, $P=0,47$), ali takođe ni sa ostalim testiranim osobinama nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija. Primenom statističkog testa multiple regresije utvrđen je koeficijent višestruke korelacije ($R=0,387$, $P=0,358$, odnosno $P>0,05$) koji ukazuje na nizak kvalitet predviđanja stepena produkcije biofilma kao zavisne promenljive, na osnovu testiranih osobina autoagregacije, hidrofobnosti, pokretljivosti pomoću pila i produkcije lektina. Utvrđena značajnost ovih osobina se kretala u opsegu 0,061-0,924, pri čemu se kao nešto značajnija osobina u odnosu na ostale izdvojila osobina hidrofobnosti ćelija ($P=0,061$).

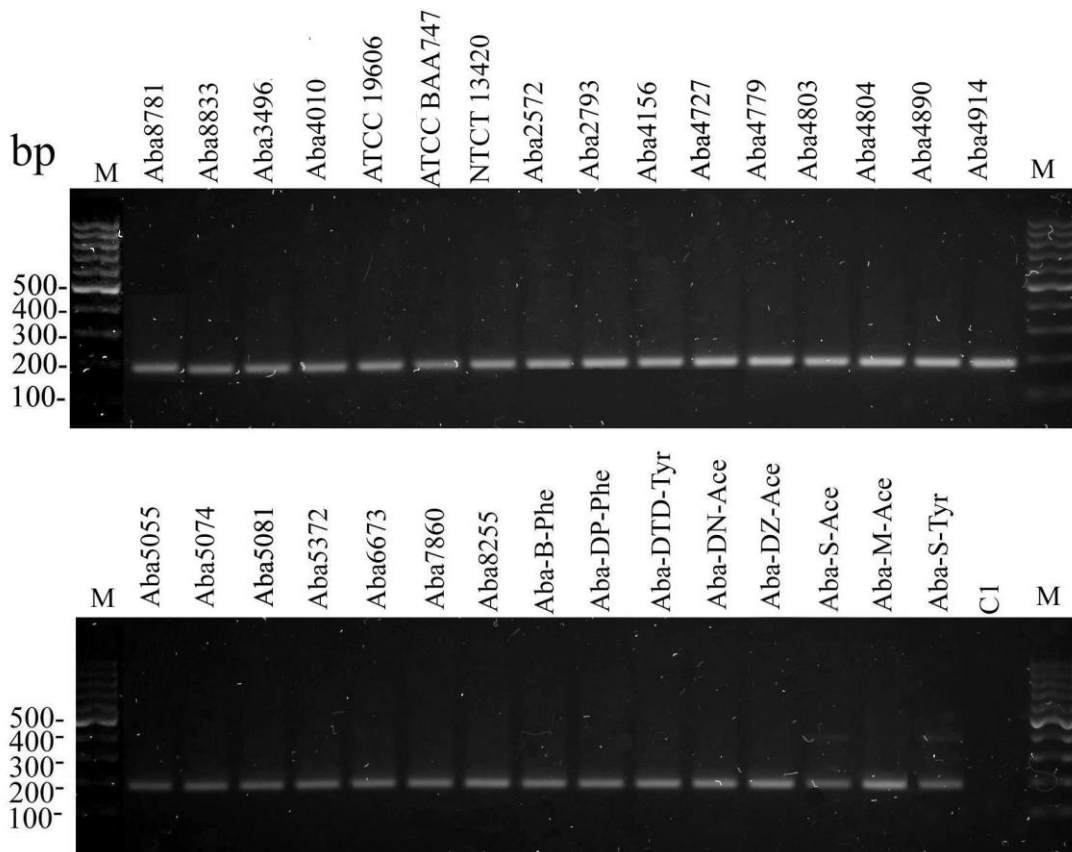
5.1.4. REZULTATI GENOTIPIZACIJE

Kod *A. baumannii* izolata utvrđeno je prisustvo gena odgovornih za njihovu rezistenciju. Osim toga analiza sličnosti DNK profila ovih izolata je potvrdila su svi sojevi klonalno različiti.

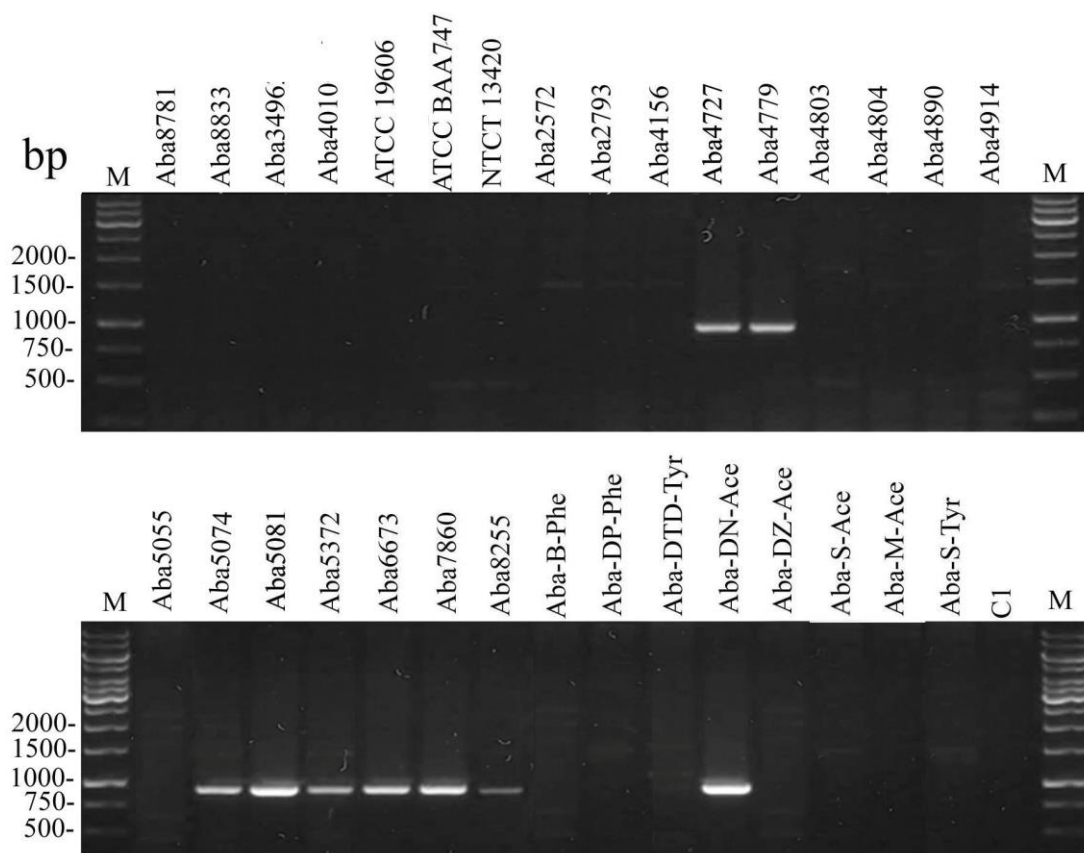
5.1.4.1. PRISUSTVO *bap*, *bla_{PER-1}*, *intI1* i *intI2* GENA

Analizom genomske DNK *A. baumannii* izolata idva izolata propadnika Acb kompleksa kod svih ispitivanih izolata utvrđeno je prisustvo *bap* gena koji kodira Bap protein (eng. *Biofilm-Associated Protein*), važnog za proces formiranja biofilma (slika 5.3).

Prisustvo *bla_{PER-1}* gena je detektovano kod ukupno 9 izolata (29,0 %), osam izolata iz rana (Aba-4727, Aba-4779, Aba-5074, Aba-5081, Aba-5372, Aba-6673, Aba-7860 i Aba-8255) i jednog izolata poreklom iz prirodne sredine (Aba-DN-Ace) (slika 5.4). Utvrđena je negativna statistički značajna linearna korelacija između produkcije PER-1 tipa β -laktamaza i potencijala ćelija da formiraju biofilm ($\tau = -0,27$, $P=0,033$), kao i sa osobinom hidrofobnosti ćelija ($\tau = -0,41$, $P=0,001$). Za razliku od ovih osobina, analizom korelacije između osobine produkcije PER-1 tipa β -laktamaza i osobina autoagregacije ($\tau = 0,05$, $P=0,68$) i pokretljivosti ($\tau = 0,11$, $P=0,39$) izolata nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija.

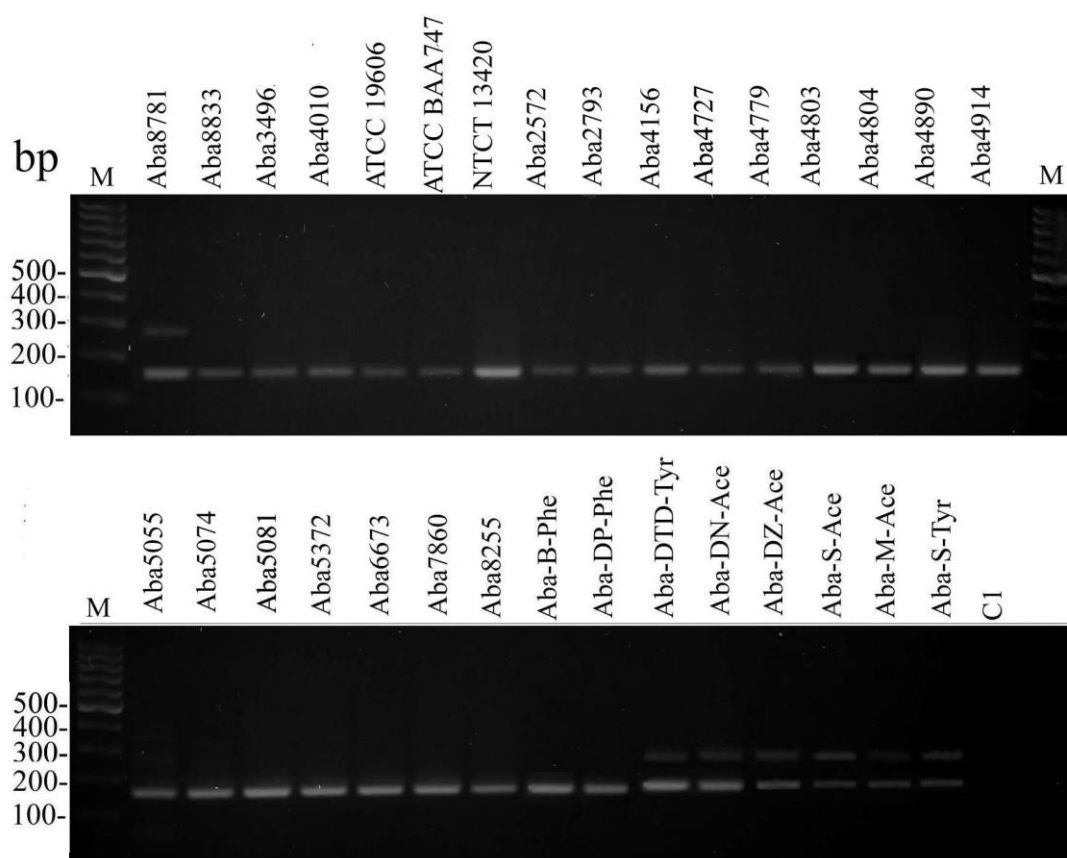


Slika 5.3. Detekcija *bap* gena kod *A. baumannii* izolata i dva izolata Acb kompleksa (M-marker, C1-negativna kontrola)



Slika 5.4. Detekcija *bla_{PER-1}* gena kod *A. baumannii* izolata i dva izolata Acb kompleksa (M-marker, C1-negativna kontrola)

Analizom genomske DNK *A. baumannii* izolata i dva soja Acb kompleksa detektovano je prisustvo *intI1* gena kod svih ispitivanih izolata, dok je prisustvo *intI2* gena detektovano kod 7 sojeva (24,1 %), od čega kod jednog izolata iz humanog patološkog materijala (Aba-8781) i šest izolata poreklom iz prirodne sredine (Aba-DTD-Tyr, Aba-DN-Ace, Aba-DZ-Ace, Aba-S-Ace, Aba-M-Ace i Aba-S-Tyr) (slika 5.5). Nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija između prisustva *intI2* gena i potencijala za formiranje biofilma testiranih izolata ($\tau = -0,11$; $P = 0,37$), kao ni sa ostalim ispitivanim osobinama: autoagregacija ($\tau = 0,09$; $P = 0,46$), hidrofobnost ($\tau = 0,14$; $P = 0,26$), pokretljivost ($\tau = -0,19$; $P = 0,14$) i produkcija lektina ($\tau = -0,11$; $P = 0,37$).

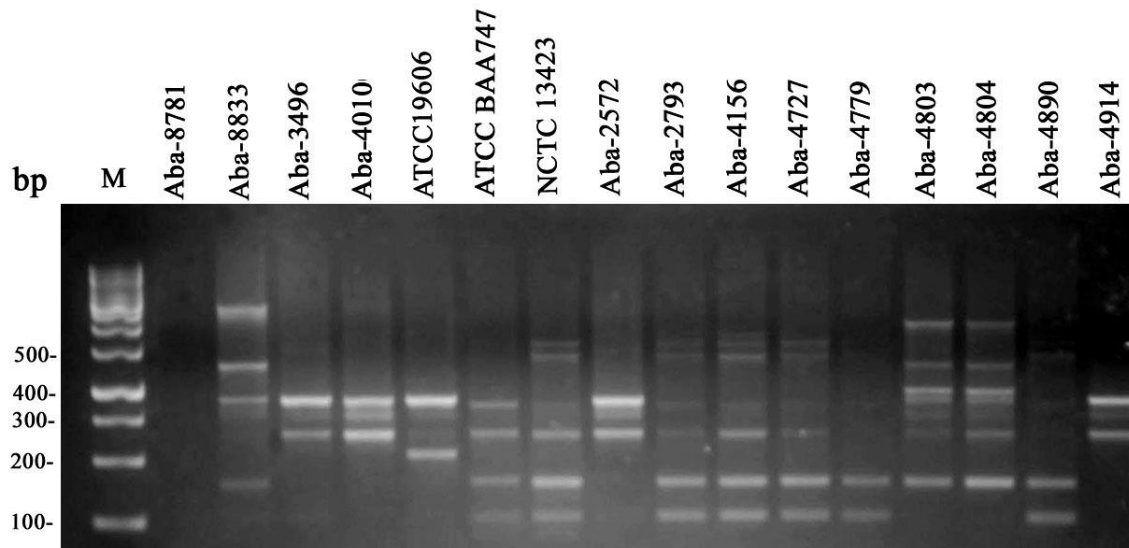


Slika 5.5. Detekcija *IntI1* i *IntI2* gena kod izolata genovrste *A. baumannii* i dva izolata Acb kompleksa (M-marker, C1-kontrola)

Bioinformatičkom analizom sekvenciranih genoma iz NCBI baze podataka utvrđeno je prisustvo, odnosno odsustvo gena ispitivanih u ovom radu. Pretragom sekvenci prajmera na hromozomima 30 kompletno sekvencioniranih genoma *A. baumannii* detektovano je prisustvo *bap* gena kod četiri soja (AB307-0294, AYE, A1 i AB5075-UW) čiji je produkt primenom prajmera *in silico* odgovarao veličini od 183 bp, dok je kod po jednog soja detektovano prisustvo *bla_{PER-1}* gena (soj 1656-2) i *IntI1* gena (soj AYE), takođe sa produktima odgovarajućih veličina (925 bp i 160 bp, redom). Soj *A. baumannii* AYE je jedini sadržao dva različita gena rezistencije, odnosno *bap* gen i tri kopije *IntI1* gena (prilog 9.7).

5.1.4.2. REZULTATI RAPD-PCR ANALIZE

Za analizu genetske varijabilnosti, odnosno bliskosti ili udaljenosti između sojeva iz kolekcije kultura *A. baumannii* i dva soja pripadnika Acb kompleksa primenjena je RAPD-PCR metoda. Na slici 5.6 prikazan je primer analize sličnosti DNK profila 16 sojeva, 3 referentna soja (ATCC 19606, ATCC BAA747 i NCTC 13423) i 13 izolata iz rana primenom prajmera OPN-02. RAPD-PCR metoda omogućila je uočavanje sličnosti i razlika između *A. baumannii* izolata (slika 5.6). Ukupan broj detektovanih produkata za sve *A. baumannii* sojeve primenom pet različitih prajmera iznosi 485 traka na gelovima. Primenom prajmera K-15 i OPN-02 detektovano je najviše produkata (ukupno za sve sojeve 118 traka), dok je najmanji broj detektovan kada je primenjen prajmer OPB-06 (ukupno 77 traka za sve sojeve). Najveći broj produkata je dobijen primenom prajmera K-15 (1-10 traka na gelu za svaki soj), nešto niži primenom prajmera OPN-02 (1-8 traka), OPB-11 (1-7 traka) i OPB-06 (1-6 traka), dok je prajmer OPA-08 dao najmanji broj RAPD-PCR produkata (0-6 traka na gelu). Kada se posmatraju pojedinačni *A. baumannii* izolati, najveći broj produkata, odnosno traka na gelu je detektovan za izolat Aba-DTD-Tyr (24 trake) iz prirodne sredine, ali i za sojeve iz rana Aba-4890 i Aba-8833 (23 trake), dok je najmanji broj produkata (svega 9) detektovano kod soja Aba-4914 (prilog 9.8).

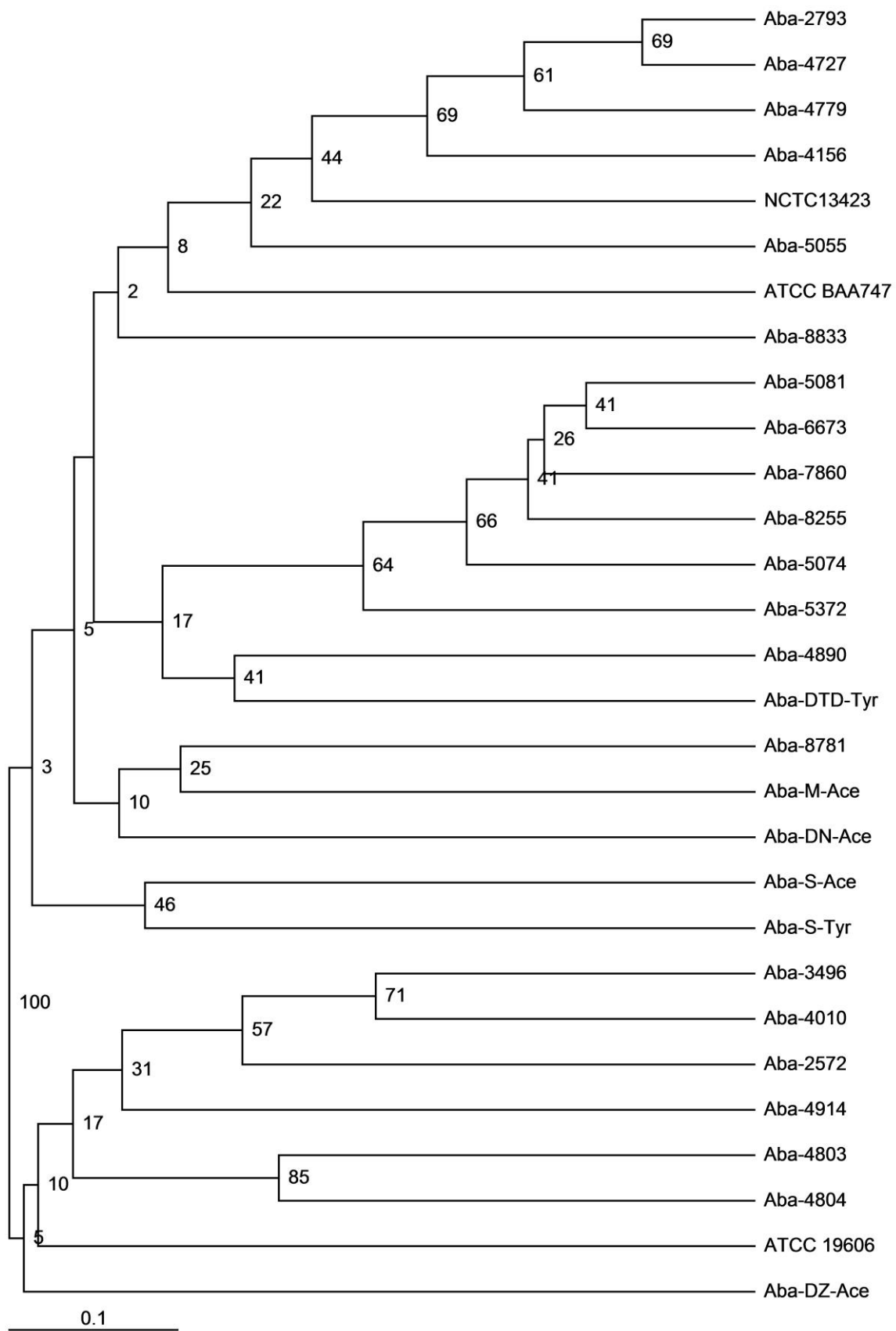


Slika 5.6. RAPD-PCR analiza sličnosti DNK profila pojedinih *A. baumannii* sojeva primenom prajmera OPN-02

Sa slike 5.6 se jasno mogu uočiti RAPD-PCR profili (eng. *fingerprint*) za svaki soj, koje formiraju produkti nastali primenom prajmera. Kada je korišćen prajmer OPN-02 detektovano je ukupno 13 različitih profila, od kojih je čak 7 različitih profila detektovano samo kod po jednog soja, dok je najdominantnije zastupljen profil detektovan kod 10 *A.*

baumannii sojeva (prilog 9.8). Primenom prajmera K-15 i OPA-08 dobijen je isti broj profila (11 različitih RAPD-PCR profila). Dominantni profil primenom prajmera K-15 detektovan je kod 9 sojeva, dok je 7 sojeva imalo profil sličan dominantnom profilu. Za prajmer OPA-08 najdominantniji profil je detektovan kod 13 sojeva. Kada je korišćen prajmer OPB-11 detektovano je 10 profila, najdominantniji profil je detektovan kod 11 sojeva, a čak 6 sojeva je imalo profil sličan ovom (nedostajala je jedna traka na gelu). Najmanji broj RAPD-PCR profila detektovan je primenom prajmera OPB-06 (7 profila) (prilog 9.8).

Filogram konstruisan na osnovu RAPD-PCR analize *A. baumannii* izolata prikazan je na slici 5.7. Kofenetički koeficijent korelacije prikazanog filograma iznosi 0,87. Detektovana sličnost između parova svih pojedinačnih sojeva bez obzira na poreklo iznosi od 0 % do 86,7 %, gde se pri najvišoj detektovanoj sličnosti grupišu dva soja Aba-2793 i Aba-4727. Svi *A. baumannii* izolati se na osnovu detektovanih RAPD-PCR profila dele u dva velika klastera, gde je jačina njihovog razdvajanja veoma značajna (*bootstrap* vrednost 100). Prvi klaster obuhvata 8 *A. baumannii* sojeva (referentni soj ATCC 19606, soj Aba-DTD-Tyr iz prorodne sredine i šest izolata iz rana), a u drugom se nalaze preostali *A. baumannii* sojevi (21 soj). Veći klaster se grana na dva nova klastera, pri čemu se u posebnoj grani izdvajaju sojevi poreklom iz prirodne sredine i iz istog uzorka (Aba-S-Ace i Aba-S-Tyr), za koje se prema rezultatima predstavjenim na filogramu može jasno uočiti da su klonalno različiti, a utvrđena sličnost iznosi 27,6 % (slika 5.7).



Slika 5.7. Filogram konstruisan na osnovu RAPD-PCR analize *A. baumannii* izolata

5.2. NEKONVENCIONALNI ANTIMIKROBNI AGENSI

Analiza hemijskog sastava prirodnih agenasa (etarskih ulja i biljnih ekstrakata) pruža informacije potrebne za njihovu dalju analizu, tumačenje rezultata i primenu kao antimikrobnih agenasa.

5.2.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA

Kvalitativna i kvantitativna analiza hemijskog sastava etarskih ulja vrsta *M. communis*, *E. camaldulensis*, *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* izvršena je primenom GC-MS tehnike. Rezultati su izraženi kao relativni udeo (%) komponenti u etarskom ulju, a prikazani su tabelarno i grafički. Sastav ostalih testiranih etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* prikazan je u doktorskoj disertaciji Lesjak (2011) i u prilogu 9.9 za etarska ulja vrste *J. communis*. Pregled hemijskog sastava etarskih ulja biljaka *S. hortensis*, *O. vulgare* subsp. *vulgare*, *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *M. x piperita*, *O. majorana*, *R. officinalis*, *F. vulgare*, *A. millefolium* i *A. dracunculus* je dat u radu Lesjak i sar. (2015), dok je sastav etarskih ulja ostalih biljaka (*H. officinalis*, *T. serpyllum*, *S. officinalis*, *R. officinalis*, *L. angustifolia*, *O. basilicum* i *T. vulgaris*) dat u prilogu 9.9.

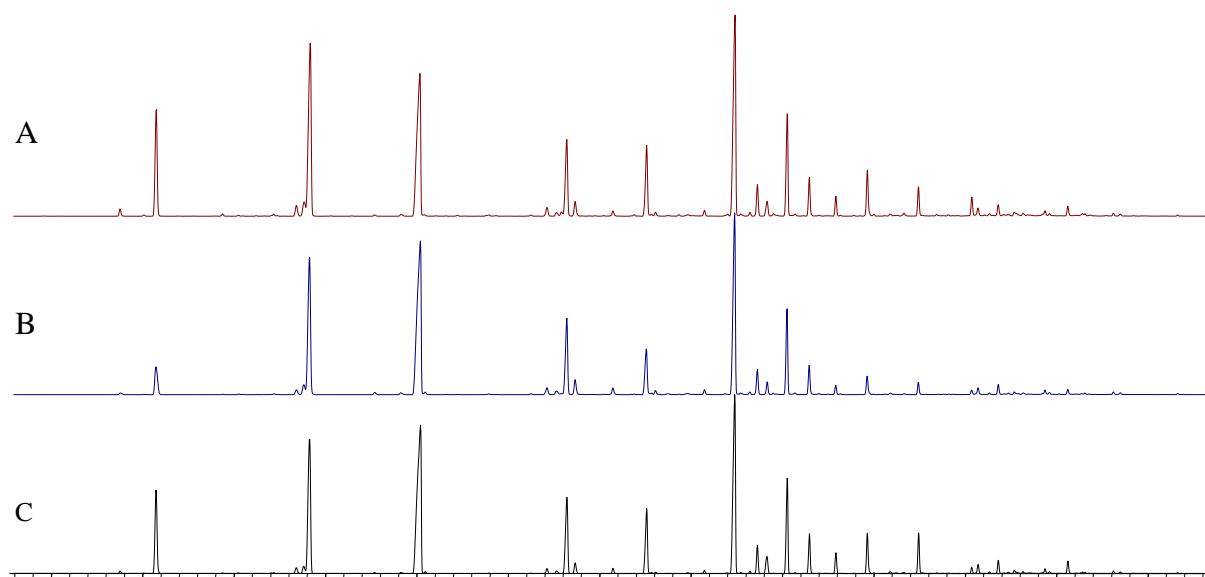
Hemijski sastav tri etarska ulja izolovana iz vrste *M. communis* sa lokaliteta Kotor, Herceg Novi i Bar prikazan je u tabeli 5.8. Detektovano je ukupno 36 komponenti, koje čine 93,34 %, 94,96 %, i 96,58 % etarskog ulja. Od svih detektovanih komponenti, identifikovano je 25, dok identifikacija preostalih jedanaest komponenti nije bila moguća usled niskog intenziteta signala i/ili odsustva sličnih spektara u bazi podataka korišćenju za identifikaciju komponenti (prilog 9.10-9.12). Najdominantnije od svih identifikovanih komponenti su linalol (18-26,5 %), mirtenil-acetat (16,5-18,5 %) i 1,8-cineol (13-16,8 %), zatim α -pinen (3,4-7,9 %), α -terpineol (6-7,5 %) i geranil acetat (6,5 %). Bradesi i sar. (1997) su predložili klasifikaciju biljaka vrste *M. communis* u dva hemotipa. Hemotip 1 (CT1) obuhvata biljke sa visokim sadržajem 1,8-cineola i α -pinena, dok hemotip 2 (CT2) obuhvata biljke sa visokim sadržajem mirtenil-acetata i niskim sadržajem α -pinena. Na osnovu predložene klasifikacije, tri analizirana *M. communis* etarska ulja poreklom iz Crne Gore mogu biti klasifikovana u hemotip 2. Najdominantnija klasa hemijskih jedinjenja detektovanih u etarskim uljima su oksidovani monoterpeni (77,7-87,04 %), dok je količina i distribucija ostalih klasa hemijskih jedinjenja (monoterpenskih i seskviterpenskih ugljovodonika) varirala.

Tabela 5.8. Hemijski sastav tri etarska ulja biljaka *Myrtus communis* sakupljenih sa tri lokaliteta Crnogorskog primorja - Kotor (MyK), Herceg Novi (MyHN) i Bar (MyB)

Komponente etarskih ulja	R.I. ^a	MyK ^b	MyHN	MyB
Izobutil-izobutirat	909	0,215	0,455	-
α-Pinen	933	6,820	7,873	3,403
<i>p</i> -Cimen	1024	0,536	0,864	0,523
Limonen	1029	0,738	1,299	1,073
1,8-Cineol	1033	13,250	16,878	15,762
<i>trans</i> -Linalol oksid	1075	-	-	0,224
Linalol	1105	22,276	18,320	26,591
Dehidro linalool	1108	-	-	0,246
4-Terpineol	1192	0,549	0,678	0,738
<i>p</i> -Cimen-8-ol	1199	0,324	0,311	0,446
Kripton	1202	-	0,288	-
α-Terpineol	1206	7,021	6,163	7,565
Mirtenol	1212	0,913	1,066	1,353
Nerol	1240	0,494	0,371	0,605
Linalil-acetat	1266	5,358	5,291	4,666
n.i. ^c	1273	-	0,274	0,380
Pinokarvil acetat	1313	0,319	0,355	0,378
Mirtenil-acetat	1338	16,561	18,009	18,489
Acetoksi eukaliptol	1352	0,239	0,217	0,202
α -Terpinil-acetat	1358	1,947	1,948	1,918
Neril acetat	1367	1,628	1,123	0,959
n.i.	1373	0,321	-	-
Geranil acetat	1385	6,520	6,589	6,515
Metil eugenol	1406	2,615	2,300	2,200
<i>trans</i> -Kariofilen	1432	1,407	1,117	0,662
α -Humulen	1465	2,785	2,859	1,504
n.i.	1522	2,536	1,609	0,869
n.i.	1589	0,523	1,148	0,325
Kariofilen oksid	1597	0,824	0,581	0,560
n.i.	1613	0,196	-	-
n.i.	1625	0,938	0,707	0,714
n.i.	1647	0,472	0,401	0,288
n.i.	1660	0,224	-	-
n.i.	1693	0,390	0,348	0,300
n.i.	1728	0,872	0,557	0,369
n.i.	1802	0,191	-	0,172
Hemijska klasa				
Monoterpenski ugljovodonici		8,094	10,036	4,999
Oksidovani monoterpini		77,720	77,881	87,037
Seskviterpenski ugljovodonici		4,192	3,976	2,166
Oksidovani seskviterpeni		0,824	0,581	0,560
Ostali		2,615	2,300	2,200
Ukupno identifikovanih komponenti		93,34	94,96	96,58

^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b Relativni udeo u etarskom ulju izražen u %; ^c n.i. - preciznija identifikacija nije bila moguća zbog slabog intenziteta i/ili odsustva sličnih spektara u korišćenim bazama

Sa slike 5.8 jasno se može uočiti da ne postoji značajna razlika u hemijskom sastavu između etarskih ulja mirte poreklom iz Crne Gore sa tri različita lokaliteta.



Slika 5.8. Uporedni prikaz hromatograma etarskih ulja mirte sa tri lokaliteta (A - *M. communis* Herceg Novi, B - *M. communis* Bar, C - *M. communis* Kotor)

U tabeli 5.9 je dat hemijski sastav dva etarska ulja *E. camaldulensis*. Na osnovu analize hemijskog sastava etarskih ulja *E. camaldulensis* poreklom iz Crne Gore detektovano je ukupno 43 različite komponente, koje čine 83,14 % etarskog ulja sa lokaliteta Herceg Novi, odnosno 91,73 % etarskog ulja sa lokaliteta Bar. Od svih detektovanih komponenti, identifikovano je čak 41, dok identifikacija dve komponente nije bila moguća usled odsustva sličnih spektara u bazi podataka korišćenoj za identifikaciju komponenti (prilog 9.13 i 9.14). Najdominantnije od svih identifikovanih komponenti su spatulenol (18,9-21,39 %), kripton (12,15-7,59 %) i p-cimen (5,35-7,56 %), zatim 1,8-cineol (1,95-7,62 %), terpinen-4-ol (3,73-5,92 %) i β -pinen (3,27-5,02 %). Uopšteno gledano, prema hemijskom sastavu etarska ulja dobijena od biljne vrste *E. camaldulensis* se mogu klasifikovati u dva različita tipa prema podeli koju je napravio Williams (2011): tip I su etarska ulja bogata cineolom, koja sadrže 80-90 % 1,8-cineola i pinen, a tip II su etarska ulja koja sadrže značajno manju količinu 1,8-cineola. Na osnovu predložene klasifikacije, oba analizirana *E. camaldulensis* etarska ulja poreklom iz Crne Gore pripadaju tipu II. Najdominantnija klasa hemijskih jedinjenja detektovanih u etarskim uljima su oksidovani monoterpeni (34,85-36,83 %), ali su i klase monoterpenskih ugljovodonika (15,58-19,77 %) i oksidovanih seskviterpena (26,10-27,20 %) takođe bile zastupljene u značajnoj količini. Jedinjenja iz klase seskviterpenskih ugljovodonika (6,61-7,94 %) bila su najslabije zastupljena u etarskim uljima *E. camaldulensis* iz Crne Gore.

Tabela 5.9. Hemijski sastav dva etarska ulja vrste *Eucalyptus camaldulensis* sakupljenih sa dva lokaliteta Crnogorskog primorja - Herceg Novi (EuHN) i Bar (EuB)

Komponente etarskih ulja	RI ^a	EuHN ^b	EuB
α -Tujen	912	0,41	0,41
α -Pinene	919	1,58	1,35
Sabinen	956	0,37	0,30
β -Pinen	961	3,27	5,02
β -Miracen	971	0,24	0,11
α -Felandren	987	0,55	0,53
p-Cimen	1009	5,35	7,56
β -Felandren	1015	3,38	4,36
γ -Terpinen	1046	0,20	0,13
α -Terpinolen	1081	0,23	-
1,8-Cineol	1017	7,62	1,95
Linalol	1091	1,37	2,02
cis-p-Ment-2-en-1-ol	1121	1,11	1,28
trans-Pinokarveol	1145	1,22	1,08
Pinokarvon	1174	0,33	0,20
Terpinen-4-ol	1191	3,73	5,92
p-Cimen-8-ol	1200	0,63	0,76
Kripton	1204	7,59	12,15
α -Terpineol	1206	0,99	-
Mirtenol	1213	0,79	0,89
Mirtenal	1214	0,45	0,61
Felandren epoksid	1219	0,34	0,20
trans-Piperitol	1224	0,44	0,41
trans-Karveol	1237	0,13	-
Kumin aldehid	1250	1,98	2,90
Felandral	1286	2,57	3,17
Kuminski alkohol	1297	1,08	1,02
Timol	1322	1,25	0,94
Mirtenil-acetat	1334	nd	0,18
α -Terpenil-acetat	1374	0,38	-
Mirtenil-acetat	1389	-	0,18
Geranil-acetat	1402	0,10	0,11
β -Elemen	1420	0,28	0,13
α -Gurjunen	1441	0,26	0,12
Aromadendren	1471	0,19	-
allo-Aromadendren	1492	2,56	3,23
ugljovodonični seskviterpen ^c	1511	0,31	0,16
Biciklogermacren	1526	2,83	4,19
δ -Kadinen	1546	0,18	0,11
Spatulenol	1608	18,90	21,39
Globulol	1610	2,66	2,43
seskviterpen ^c	1660	2,23	1,54
Izobiciklogermakrenal	1767	2,31	1,83
Hemijska klasa			
Monoterpenski ugljovodonici		15,58	19,77
Oksidovani monoterpeni		34,85	36,83
Seskviterpenski ugljovodonici		6,61	7,94
Oksidovani seskviterpeni		26,1	27,2
Ostali		2,23	1,54
Ukupno identifikovanih komponenti		83,14	91,73

^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b Relativni udeo u etarskom ulju izražen u %; ^c Preciznija identifikacija nije bila moguća zbog slabog intenziteta i/ili odsustva sličnih spektara u korišćenim bazama

U tabeli 5.10 je prikazan hemijski sastav etarskih ulja biljaka *Juniperus oxycedrus* (iglice, Hvar) i *Juniperus phoenicea* (šišarke, Hvar). Na osnovu analize hemijskog sastava etarskih ulja dve biljke roda *Juniperus* poreklom iz Hrvatske, u etarskom ulju *J. oxycedrus* detektovano je ukupno 32 različite komponente, koje čine 99,99 % ovog etarskog ulja, dok je u etarskom ulju *J. phoenicea* detektovano ukupno 29 različitih komponenti, koje čine 100,00 % etarskog ulja. Od svih detektovanih komponenti, u etarskom ulju *J. oxycedrus* identifikovano je 20, a u etarskom ulju *J. phoenicea* 25 različitih komponenti, dok identifikacija 12 komponenti ulja *J. oxycedrus*, odnosno 4 komponente ulja *J. phoenicea* nije bila moguća usled odsustva sličnih spektara u bazi podataka korišćenju za identifikaciju jedinjenja (prilog 9.15 i 9.16). Najdominantnije od svih identifikovanih komponenti etarskog ulja *J. oxycedrus* su β -mircen (34,23 %), α -pinen (20,38 %), germakren D (11,18 %) i limonen (10,47 %), dok su dominantne komponente etarskog ulja *J. phoenicea* bile α -pinen (60,89 %), germakren D (8,40 %), *trans*-kariofilen (3,95 %) i β -mircen (3,86 %). Hemijski sastav preostalih sedam korišćenih etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* (*Juniperus sabina*, *Juniperus sibirica*, *Juniperus communis*, *Juniperus macrocarpa*, *Juniperus excelsa*, *Juniperus foetidissima*, *Juniperus phoenicea*) dat je u referenci Lesjak (2011), a kratak pregeled njihovih dominantnih komponenti je dat u Tabeli 4.5.

Tabela 5.10. Identifikovana jedinjenja u etarskim uljima *Juniperus oxycedrus* (iglice, Hvar) i *Juniperus phoenicea* (šišarke, Hvar)

Komponenta etarskih ulja	KI ^a	<i>J. oxycedrus</i> ^b	<i>J. phoenicea</i>
α-pinen	934	20,379	60,885
kamfen	949	-	0,575
sabinen	972	-	0,643
β -pinen	977	1,671	3,202
β-mircen	989	34,229	3,862
α -felandren	1003	-	0,307
p-cimen	1024	-	0,455
limonene	1029	10,474	-
β -felandren	1030	-	3,600
α -terpinolen	1093	0,673	0,366
kamfor	1151	-	0,753
terpinen-4-ol	1192	0,961	0,286
α -terpineol	1205	0,529	0,776
bornil acetat	1300	1,026	-
terpinil acetat	1358	-	1,929
α -kubeben	1361	0,256	-
geranil acetat	1384	0,784	-
α -kopaen	1388	0,453	-
β -elemen	1401	-	0,571
<i>trans</i> -kariofilen	1432	2,100	3,945
seskviterpen ^c	1440	0,246	0,259
β -farnezen	1455	0,479	-
α -humulen	1465	2,081	2,224
γ -muurolen	1484	1,329	0,410
germakren D	1492	11,180	8,403
seskviterpen	1502	0,398	-

α -muurolen	1505	0,900	0,842
γ -kadinen	1521	0,857	0,484
δ -kadinen	1528	3,207	1,159
elemol	1553	-	0,541
seskviterpen	1560	0,622	-
germakren B	1569	-	1,324
seskviterpen	1589	0,264	0,373
seskviterpen	1592	0,745	-
seskviterpen	1597	0,483	0,490
seskviterpen	1607	0,301	-
seskviterpen	1622	0,713	-
seskviterpen	1639	-	0,489
seskviterpen	1653	0,572	-
α -kadinol	1668	1,194	0,576
seskviterpen	1693	0,265	0,272
seskviterpen	1705	0,392	-
diterpen	1980	0,236	-

Hemijska klasa

Monoterpeni	67,43	74,65
Oksidovani monoterpeni	3,56	2,99
Seskviterpeni	27,59	21,25
Oksidovani seskviterpeni	1,19	1,11
Ostali	0,24	0,0

Ukupno identifikovanih komponenti 99,99 100,0

^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b Relativni udeo u etarskom ulju izražen u %; ^c Preciznija identifikacija nije bila moguća zbog slabog intenziteta i/ili odsustva sličnih spektara u korišćenim bazama

5.3. EFEKAT NEKONVENCIONALNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA NA *A. baumannii* IZOLATE

Okarakterisani nekonvencionalni prirodni agensi su korišćeni za utvrđivanje antimikrobnog efekta na ćelije vrste *A. baumannii*.

5.3.1. EFEKAT NEKONVENCIONALNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA NA *A. baumannii* IZOLATE U TEČNOJ KULTURI

Rezultati osetljivosti *A. baumannii* izolata na nekonvencionalne antimikrobne agense su prikazani u tabelama 5.11-5.17. Antibakterijska aktivnost nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa je varirala među sojevima. Sva tri ispitana etarska ulja vrste *M. communis* (MyHN, MyK, MyB) i dva etarska ulja *E. camaldulensis* (EuHN i EuB) su pokazala značajnu, ali i sličnu antibakterijsku aktivnost (tabela 5.11). Kao alternativni antimikrobni agensi, etarska ulja ovih vrsta su ispoljila bakteriostatski i baktericidni efekat protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana.

Etarska ulja vrste *M. communis* su bila efikasna protiv *A. baumannii* izolata sa MIC vrednostima u opsegu od 0,25 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a vrednost modusa je iznosila 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za etarska ulja MyHN i MyK, dok je za etarsko ulje MyB modus vrednost bila nešto niža i iznosila je 1,41 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Preciznije, MIC vrednosti za etarsko ulje MyHN su varirale od 1,41 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, za MyB od 0,25 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, i za MyK od 0,71 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. MBC vrednosti su bile iste ili dvostruko veće od MIC vrednosti (tabela 5.11). Utvrđena je statistički značajna razlika između MIC i MBC vrednosti za sva tri etarska ulja ($P_{\text{MyHN}}=0,001$; $P_{\text{MyB}}=0,000$; $P_{\text{MyK}}=0,006$). Najosetljiviji izolat na sva ispitivana ulja vrste *M. communis*, ne računajući referentne sojeve, je ambulatni izolat Aba-8833.

Etarska ulja *E. camaldulensis* su ispoljila antibakterijsku aktivnost sa MIC vrednostima u opsegu od 0,5 do 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a vrednost modusa je iznosila 1,41 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za etarsko ulje EuHN, odnosno 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za etarsko ulje EuB. Tačnije, MIC vrednosti za etarsko ulje EuHN su varirale od 0,5 do 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a za EuB od 0,5 do 1,41 $\mu\text{L mL}^{-1}$, dok su MBC vrednosti bile u opsegu od 0,71 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za EuHN, odnosno do 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za EuB. Oba etarska ulja biljaka roda *Eucalyptus* su se pokazala kao efikasna protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata, pri čemu je etarsko ulje EuB ispoljilo nešto bolju antibakterijsku aktivnost, delujući bakteriostatski i baktericidno u nižim koncentracijama (tabela 5.11). Utvrđena je statistički značajna razlika između MIC i MBC vrednosti za oba etarska ulja ($P_{\text{EuHN}}=0,001$; $P_{\text{EuB}}=0,000$). Kao i u slučaju etarskih ulja mirte, najosetljiviji izolat na sva ispitivana ulja vrste *E. camaldulensis* je ambulatni izolat Aba-8833, ali i soj Aba-8781.

Antimikrobna aktivnost biljaka iz roda *Juniperus* je dosta varirala (tabele 5.12 i 5.13). Etarsko ulje vrste *J. foetidissima* se pokazalo kao najefikasnije protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata u odnosu na ostala etarska ulja biljaka ovog roda. MIC vrednosti ovog ulja

su varirale u opsegu od 1 do 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a MBC vrednosti od 1 do $>4 \mu\text{L mL}^{-1}$. Etarsko ulje *J. sabina* je ispoljilo samo bakteriostatsku aktivnost i to protiv svega šest *A. baumannii* izolata u opsegu 2,83 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Za razliku od ovog ulja, etarska ulja *J. oxycedrus* ekstrahovano iz iglica i šišarki i *J. sibirica* iz šišarki nisu ispoljila ni bakteriostatsku ni baktericidnu aktivnost, jer su MIC i MBC vrednosti protiv svih *A. baumannii* izolata bile $>4 \mu\text{L mL}^{-1}$. Međutim, etarsko ulje iglica iste vrste *J. sibirica* je ispoljilo bakteriostatsku i baktericidnu aktivnost protiv većine izolata sa MIC i MBC vrednostima 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, osim za izolat Aba-3496 i referentni soj ATCC 19606 gde su MIC i MBC vrednosti bile veće od 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (tabela 5.12). *J. phoenicea* etarsko ulje iglica je pokazalo samo bakteriostatsku aktivnost i to protiv 15 multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana sa MIC vrednošću 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Etarsko ulje iste biljne vrste ekstrahovano iz šišarki pokazalo je takođe samo bakteriostatsku aktivnost sa istoj MIC vrednosti, ali protiv svega dva izolata (Aba-5372 i Aba-8255).

Etarska ulja vrste *J. communis* poreklom iz Bosne i Hercegovine, jedno ekstrahovano iz iglica, a drugo iz šišarki, nisu ispoljila ni bakteriostatsku ni baktericidnu aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata (tabela 5.13). Etarsko ulje iste biljne vrste, ali poreklom sa Fruške gore, ekstrahovano iz šišarki je ispoljilo samo bakteriostatski efekat protiv četiri izolata, tri bolnička (Aba-4914, Aba-5055, Aba-5085) i jednog ambulatnog izolata (Aba-8833). Etarsko ulje ove vrste sa lokaliteta Fruška gora, ekstrahovano iz iglica, ispoljilo je i bakteriostatski i baktericidni efekat. MIC vrednosti ovog ulja su varirale od 2-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, osim za soj Aba-4156 za koji je MIC vrednost iznosila $>4 \mu\text{L mL}^{-1}$. Baktericidni efekat je ovo ulje ispoljilo samo prema sedam izolata sa MBC vrednostima 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Etarska ulja vrsta *J. macrocarpa* i *J. excelsa* ekstrahovana iz šišarki nisu posedovala anti-*A. baumannii* aktivnost, dok su etarska ulja iglica ispoljila bakteriostatsku aktivnost. *J. macrocarpa* etarsko ulje je ispoljilo bakteriostatski efekat protiv dva (NCTC 13423 i Aba-2572), a ulje *J. excelsa* samo protiv jednog *A. baumannii* izolata (Aba-4156).

Tabela 5.11. MIC i MBC vrednosti etarskih ulja lista biljaka porodice Myrtaceae, vrsta *E. camalulensis* i *M. communis* protiv *A. baumannii* izolata iz rana

<i>A. baumannii</i> izolati	<i>E. camaldulensis</i> etarska ulja				<i>M. communis</i> etarska ulja					
	EuHN		EuB		MyHN		MyB		MyK	
	MIC*	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ATTC 19606	2,00	2,00	1,41	2,00	1,41	4,00	2,00	2,83	4,00	4,00
ATCC BAA747	1,00	1,00	1,00	1,00	1,41	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
NCTC 13423	1,00	2,00	1,00	1,41	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Aba-2572	0,71	1,00	1,00	2,00	4,00	4,00	1,41	2,00	4,00	4,00
Aba-2793	1,41	2,00	1,00	2,00	2,00	4,00	1,00	2,00	2,00	4,00
Aba-4156	1,41	4,00	1,00	2,00	2,00	4,00	0,71	1,41	2,00	2,00
Aba-4727	1,41	4,00	1,00	2,00	2,00	4,00	1,00	1,41	2,00	4,00
Aba-4779	1,41	4,00	1,00	2,00	2,83	4,00	1,00	2,00	2,00	2,00
Aba-4803	1,41	2,00	1,00	1,00	2,83	2,83	1,00	1,00	2,00	2,00
Aba-4804	1,00	2,00	1,00	1,00	2,83	4,00	0,25	0,71	2,00	2,00
Aba-4890	1,41	4,00	1,00	1,00	4,00	4,00	1,41	4,00	2,83	4,00
Aba-4914	1,00	2,00	1,00	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00
Aba-5055	1,00	1,41	1,00	2,00	1,41	2,00	1,41	2,83	2,00	4,00
Aba-5074	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	2,83	4,00
Aba-5081	1,00	2,00	0,50	2,00	2,00	2,00	2,83	2,83	2,00	2,00
Aba-5372	2,00	1,41	1,00	1,00	2,00	4,00	1,41	4,00	1,41	2,00
Aba-6673	1,41	2,00	1,41	2,00	2,00	4,00	2,00	2,83	2,00	2,00
Aba-7860	1,41	2,00	1,00	2,00	2,00	4,00	2,00	2,83	2,00	2,00
Aba-8255	2,00	2,00	1,41	1,41	2,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Aba-8781	0,71	0,71	0,50	0,71	2,00	2,00	1,41	4,00	2,83	4,00
Aba-8833	0,50	0,71	0,50	0,71	1,41	1,41	1,41	2,83	0,71	0,71
Aba-3496	1,00	1,00	0,71	0,71	1,41	2,00	1,41	4,00	2,00	4,00
Aba-4010	1,41	2,00	1,00	1,41	2,00	2,00	2,00	4,00	2,00	2,00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00

*MIC, minimalna inhibitorna koncentracija, MBC, minimalna baktericidna koncentracija, vrednosti su izražene u jedinicama $\mu\text{L mL}^{-1}$ i predstavljaju geometrijsku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje dva nezavisna ponavljanja; fontom „**bold**“ označena su etarska ulja veoma izražena i izražene antimikrobne aktivnosti

Tabela 5.12. MIC i MBC etarskih ulja iglica i šišarki ekstrahiranih iz pet vrsta roda *Juniperus* protiv *A. baumannii* izolata iz rana

<i>A. baumannii</i> izolati	<i>J. foetidissima</i>		<i>J. sabina</i>		<i>J. sibirica</i>				<i>J. oxycedrus</i>				<i>J. phoenicea</i>			
	iglice		iglice		iglice		šišarke		iglice		šišarke		iglice		šišarke	
	MIC*	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ATTC 19606	2,00	2,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
ATCC BAA747	1,00	1,00	4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
NCTC 13423	1,00	2,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-2572	2,00	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-2793	2,00	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4156	1,41	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4727	1,41	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4779	1,41	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4803	1,41	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4804	1,41	1,41	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4890	2,00	2,00	4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4914	2,00	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-5055	1,41	1,41	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-5074	1,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-5081	1,41	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-5372	1,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00
Aba-6673	1,00	4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-7860	2,00	2,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-8255	1,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00
Aba-8781	1,41	1,41	4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-8833	1,00	1,41	4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-3496	2,00	2,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4010	1,00	>4,00	2,83	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	>4,00	>4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00

*MIC, minimalna inhibitorna koncentracija, MBC, minimalna baktericidna koncentracija, vrednosti su izražene u jedinicama $\mu\text{L mL}^{-1}$ i predstavljaju geometrijsku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje dva nezavisna ponavljanja; fontom „**bold**“ označena su etarska ulja veoma izražena i izražene antimikrobne aktivnosti

Tabela 5.13. MIC i MBC vrednosti etarskih ulja iglica i šišarki ekstrahovanih iz tri različite vrste roda *Juniperus* protiv *A. baumannii* iz rana

<i>A. baumannii</i> izolati	<i>J. communis</i> BiH				<i>J. communis</i> Fruška gora				<i>J. macrocarpa</i>				<i>J. excelsa</i>			
	šišarke		iglice		šišarke		iglice		šišarke		iglice		šišarke		iglice	
	MIC*	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ATTC 19606	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
ATCC BAA747	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
NCTC 13423	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-2572	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-2793	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4156	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4727	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4779	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4803	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4804	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4890	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4914	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-5055	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-5074	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-5081	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-5372	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-6673	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-7860	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-8255	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-8781	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-8833	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	2,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-3496	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
Aba-4010	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	2,00	4,00	4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00	>4,00

*MIC, minimalna inhibitorna koncentracija, MBC, minimalna baktericidna koncentracija, vrednosti su izražene u jedinicama $\mu\text{L mL}^{-1}$ i predstavljaju geometrijsku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje dva nezavisna ponavljanja

Antibakterijska aktivnost etarskih ulja biljaka iz porodica Lamiaceae, Asteraceae i Apiaceae prikazana je u tabelama 5.14-5.16, gde se jasno može uočiti da su sva ispitivana etarska ulja ekstrahovana iz ovih aromatičnih biljaka posedovala antibakterijski efekat protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana. Etarska ulja biljnih vrsta *Artemisia dracuncululus*, *Foeniculum vulgare*, *Hissopus officinalis* i *Mentha x piperita* su ispoljila i bakteriostatsku i baktericidnu aktivnosti sa MIC i MBC vrednostima u opsegu od 2 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, i vrednošću modusa 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Najslabiju antibakterijsku aktivnost ispoljilo je etarsko ulje vrste *Petroselinum crispum* na koje je bilo osetljivo 10 sojeva *A. baumannii*. Etarska ulja vrsta *Petroselinum crispum* i *Rosmarinus officinalis* su svoju antibakterijsku aktivnost ispoljila samo prema nekim *A. baumannii* izolatima pri koncentracijama 2,83-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Za razliku od ove dve vrste, nešto bolju antibakterijsku aktivnost posedovala su ostala etarska ulja, jer su ispoljila antimikrobni efekat protiv svih ispitivanih *A. baumannii* izolata. MIC vrednosti etarskog ulja *Origanum majorana* su iznosile 2-2,83 $\mu\text{L mL}^{-1}$, etarskog ulja *Satureja hotensis* 1-2,83 $\mu\text{L mL}^{-1}$, dok su za etarsko ulje *Thymus serpyllum* MIC vrednosti varirale od 1,41 do 2,83 $\mu\text{L mL}^{-1}$. MBC vrednosti su bile iste kao i MIC vrednosti ili dvostruko veće. Takođe, etarska ulja vrsta *Lavandula angustifolia*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Melissa officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Achillea millefolium* i *Thymus vulgaris* su pri koncentracijama 0,25-2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ispoljila isti efekat. Najizraženija antimikrobna aktivnost je detektovana za ulja vrsta *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* i *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, čija je MIC vrednost za pojedine multiplo rezistentne *A. baumannii* izolate bila manja od 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (tabela 5.14). Statistički značajna razlika između MIC i MBC vrednosti, odnosno u bakteriostatskom i baktericidnom efektu, utvrđena je kod etarskih ulja vrsta *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Origanum majorana*, *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum* i *Achillea millefolium* ($P \leq 0,05$).

Tabela 5.14. MIC i MBC vrednosti etarskih ulja sedam aromatičnih biljaka* iz porodice Lamiaceae protiv *A. baumannii* izolata iz rana

<i>A. baumannii</i> izolati	<i>Hyssopus officinalis</i>		<i>Mentha x piperita</i>		<i>Satureja hortensis</i>		<i>Thymus serpyllum</i>		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>		<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	
	MIC**	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ATTC 19606	2,83	2,83	2,83	2,83	2,00	2,00	2,83	2,83	2,00	2,00	2,00	2,00	0,50	1,00
ATCC BAA747	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,41	1,41	1,41	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
NCTC 13423	4,00	4,00	2,83	2,83	2,00	2,00	2,83	2,83	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
Aba-2572	4,00	4,00	2,83	2,83	2,83	2,83	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,35	0,50
Aba-2793	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,41	2,00	≤0,125	0,125	0,71	1,00
Aba-4156	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,83	2,83	2,83	2,00	4,00	2,00	2,00	0,18	0,25
Aba-4727	4,00	4,00	4,00	4,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	0,50	0,50
Aba-4779	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	1,00	1,00	≤0,125	0,125
Aba-4803	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	0,5	0,50	≤0,125	0,125
Aba-4804	4,00	4,00	4,00	4,00	2,83	2,83	2,83	2,83	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Aba-4890	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	≤0,125	≤0,125
Aba-4914	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00
Aba-5055	4,00	4,00	4,00	4,00	2,83	2,83	2,00	2,00	0,50	0,50	1,00	2,00	≤0,125	0,125
Aba-5074	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	1,41	2,00	1,00	1,00	0,50	0,50	≤0,125	≤0,125
Aba-5081	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	1,41	1,41	0,25	0,50	0,71	1,00	≤0,125	≤0,125
Aba-5372	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	1,41	1,41	1,00	1,00	0,35	0,50	≤0,125	≤0,125
Aba-6673	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00	0,50	0,50
Aba-7860	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	0,50	1,00	≤0,125	≤0,125
Aba-8255	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	≤0,125	≤0,125
Aba-8781	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,50	0,50	1,41	2,00	≤0,125	≤0,125
Aba-8833	2,83	2,83	2,00	2,00	2,00	2,00	1,41	1,41	0,35	0,50	1,41	2,00	0,50	0,50
Aba-3496	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,83	2,83	0,50	0,50	2,00	2,00	0,50	0,50
Aba-4010	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	4,00	4,00	1,41	4,00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,50	1,00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	0,125	0,25

*Poreklo biljaka, kao i delovi biljaka iz kojih je vršena ekstrakcija etarskih ulja prikazani su u tabeli 4.5; **MIC, minimalna inhibitorna, MBC, minimalna baktericidna koncentracija, predstavljaju geometrijsku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje dva nezavisna ponavljanja ($\mu\text{L mL}^{-1}$); fontom „**bold**“ označena su etarska ulja veoma izražene i izražene antimikrobne aktivnosti

Tabela 5.15. MIC i MBC vrednosti etarskih ulja šest aromatičnih biljaka* iz porodice Lamiaceae protiv *A. baumannii* izolata iz rana

<i>A. baumannii</i> izolati	<i>Origanum majorana</i>		<i>Salvia officinalis</i>		<i>Melissa officinalis</i>		<i>Lavandula angustifolia</i>		<i>Ocimum basilicum</i>		<i>Rosmarinus officinalis</i>	
	MIC**	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ATTC 19606	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00
ATCC BAA747	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00
NCTC 13423	2,00	2,83	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,83	4,00	>4,00	>4,00
Aba-2572	2,83	2,83	2,00	4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00	4,00	>4,00
Aba-2793	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00
Aba-4156	2,00	2,83	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	4,00	>4,00
Aba-4727	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,41	2,00	4,00	>4,00
Aba-4779	2,00	2,83	0,71	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Aba-4803	2,00	2,00	0,50	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	>4,00	>4,00
Aba-4804	2,83	2,83	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00
Aba-4890	2,00	2,00	0,50	1,00	2,00	2,00	1,41	2,00	1,41	2,00	>4,00	>4,00
Aba-4914	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,83	4,00
Aba-5055	2,00	2,83	1,00	1,00	1,41	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,00	4,00
Aba-5074	2,83	2,83	0,35	0,50	1,41	2,00	1,00	1,00	1,41	2,00	2,83	4,00
Aba-5081	2,00	2,00	0,50	1,00	2,00	2,00	0,71	1,00	0,71	1,00	2,83	4,00
Aba-5372	2,83	2,83	0,35	0,50	1,41	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00
Aba-6673	2,83	2,83	1,41	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,41	2,00	4,00	4,00
Aba-7860	2,83	2,83	0,50	1,00	1,41	2,00	2,83	4,00	2,00	2,00	2,83	4,00
Aba-8255	2,00	2,00	1,00	1,00	1,41	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,00	4,00
Aba-8781	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,00	4,00
Aba-8833	2,00	2,00	1,00	1,00	1,41	2,00	1,00	1,00	1,41	2,00	4,00	4,00
Aba-3496	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00	4,00	4,00
Aba-4010	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	1,00	1,00	2,83	>4,00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00

*Poreklo biljaka, kao i delovi biljaka iz kojih je vršena ekstrakcija etarskih ulja prikazani su u tabeli 4.5; **MIC, minimalna inhibitorna, MBC, minimalna baktericidna koncentracija, predstavljaju geometrijsku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje dva nezavisna ponavljanja ($\mu\text{L mL}^{-1}$); fontom „**bold**“ označena su etarska ulja veoma izražene i izražene antimikrobne aktivnosti

Tabela 5.16. MIC i MBC vrednosti etarskih ulja aromatičnih biljaka iz porodica Asteraceae i Apiaceae protiv *A. baumannii* izolata

<i>A. baumannii</i> izolati	<i>Foeniculum vulgare</i>		<i>Petroselinum crispum</i>		<i>Coriandrum sativum</i>		<i>Artemisia dracunculus</i>		<i>Achillea millefolium</i>	
	MIC*	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ATTC 19606	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00
ATCC BAA747	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00
NCTC 13423	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,83	4,00	4,00	4,00	2,00	4,00
Aba-2572	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00
Aba-2793	2,00	4,00	2,00	2,83	2,00	2,00	2,83	2,83	2,00	2,00
Aba-4156	4,00	4,00	4,00	4,00	2,83	4,00	4,00	4,00	2,00	4,00
Aba-4727	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,83	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00
Aba-4779	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	1,41	2,00
Aba-4803	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00
Aba-4804	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,83	4,00
Aba-4890	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00
Aba-4914	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00
Aba-5055	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	1,41	2,00
Aba-5074	4,00	4,00	>4,00	>4,00	1,41	2,00	4,00	4,00	1,00	1,00
Aba-5081	4,00	4,00	4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	1,41	2,00
Aba-5372	4,00	4,00	4,00	>4,00	1,41	2,00	4,00	4,00	1,00	1,00
Aba-6673	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00
Aba-7860	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	1,00	1,00
Aba-8255	4,00	4,00	4,00	4,00	1,41	2,00	4,00	4,00	1,41	2,00
Aba-8781	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	2,00
Aba-8833	2,00	2,83	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,41	2,00
Aba-3496	4,00	4,00	4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	1,41	2,00
Aba-4010	4,00	4,00	>4,00	>4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	4,00	2,00	4,00	2,00	2,00

*MIC, minimalna inhibitorna, MBC, minimalna baktericidna koncentracija, predstavljaju geometrijsku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje dva nezavisna ponavljanja ($\mu\text{L mL}^{-1}$)

Na osnovu utvrđene anti-*A. baumannii* aktivnosti izračunata je statistička značajnost razlika u aktivnosti između korištenih etarskih ulja primenom statističkog Wilcoxon rank testa, na osnovu čega se sva korišćena etarska ulja mogu svrstati u četiri grupe. Prva grupa obuhvata etarska ulja veoma izražene aktivnosti ($\leq 0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$), u drugu grupu spadaju etarska ulja izražene aktivnosti ($0,5-2 \mu\text{L mL}^{-1}$), treću grupu čine etarska ulja umerene aktivnosti ($2-4 \mu\text{L mL}^{-1}$) i četvrta grupa obuhvata etarska ulja slabe aktivnosti ($\geq 4 \mu\text{L mL}^{-1}$) (tabela 5.17). Prva kategorija obuhvata samo etarsko ulje vrste *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* koje se izdvojilo i statistički značajno razlikovalo po svojoj antibakterijskoj aktivnosti protiv *A. baumannii* izolata iz rana u odnosu na sva ostala testirana etarska ulja. Kategorija etarskih ulja sa izraženom anti-*A. baumannii* aktivnošću je obuhvatila čak devet etarskih ulja, za koja nije utvrđena međusobna statistički značajna razlika u aktivnosti. Tri etarska ulja ove kategorije su ekstrahovana iz biljaka porodice Myrtaceae, jedno iz porodice Cupressaceae (*J. foetidissima*) i pet etarskih ulja biljaka porodice Lamiaceae. Prema istom kriterijumu treća kategorija etarskih ulja koja su ispoljila umereni antibakterijski efekat obuhvatila je osam etarskih ulja: dva ulja su ekstrahovana iz biljaka porodice Myrtaceae, pet iz porodice Lamiaceae i po jedno iz porodica Asteraceae (*A. millefolium*) i Apiaceae (*C. sativum*). Etarska ulja koja su ispoljila najslabiji bakteriostatski efekat su pripremljena iz biljaka porodice Cupressaceae, dok su tri ulja ekstrahovana iz biljaka porodice Lamiaceae (*M. x piperita*, *R. officinalis* i *H. officinalis*), dva iz biljaka porodice Apiaceae (*F. vulgare* i *P. crispum*), i jedno ulje je ekstrahovano iz porodice Asteraceae (*A. dracunculus*).

Tabela 5.17. Klasifikacija etarskih ulja na osnovu anti-*A. baumannii* aktivnosti

Etarska ulja veoma izražene aktivnosti	Etarska ulja izražene aktivnosti	Etarska ulja umerene aktivnosti	Etarska ulja slabe aktivnosti
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	<i>E. camaldulensis</i> (EuB) <i>T. vulgaris</i> <i>E. camaldulensis</i> (EuHN) <i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> <i>S. officinalis</i> <i>J. foetidissima</i> (iglice) <i>M. communis</i> (MyB) <i>O. basilicum</i> <i>L. angustifolia</i>	<i>A. millefolium</i> <i>M. officinalis</i> <i>T. serpyllum</i> <i>S. hortensis</i> <i>C. sativum</i> <i>M. communis</i> (MyHN) <i>M. communis</i> (MyK) <i>O. majorana</i>	<i>M. x piperita</i> <i>R. officinalis</i> <i>F. vulgare</i> <i>A. dracunculus</i> <i>H. officinalis</i> <i>P. crispum</i> vrste roda <i>Juniperus</i>

Antibakterijska aktivnost biljnih ekstrakata je prikazana u tabeli 5.18. Ekstrakti biljaka *Rumex sanguineus* i *Rumex crispus* su pokazali značajnu bakteriostatsku i baktericidnu aktivnost. Ekstrakti vrste *Rumex sanguineus* sa lokaliteta Zmajevac na Fruškoj gori (4NZ_H_p i 4NZ_R) su ispoljili bakteriostatsku aktivnost u opsegu MIC vrednosti $1-2,83 \text{ mg mL}^{-1}$ za ekstrakt nadzemnog dela biljke (herbe), odnosno $1,41-2,83 \text{ mg mL}^{-1}$ za ekstrakt podzemnog dela biljke (rizoma). Baktericidni efekat ekstrakata ove vrste zabeležen pri istim MBC vrednostima ($2-5,66 \text{ mg mL}^{-1}$) bez obzira na deo biljke od kog je pripremljen ekstrakt. Ekstrakti iste biljne vrste sa lokaliteta Iriški venac na Fruškoj gori (4Z_H_p i 4Z_R) su

takođe ispoljili bakteriostatski i baktericidni efekat, pri MIC vrednostima 1-2 mg mL⁻¹ za ekstrakt herbe, odnosno 1,41-2,83 mg mL⁻¹ za ekstrakt rizoma, dok su MBC vrednosti varirale u opsegu 1-2,83 mg mL⁻¹ za ekstrakt herbe, odnosno 1,41-5,66 mg mL⁻¹ za ekstrakt rizoma. Kao najefikasniji ekstrakt protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata pokazao se ekstrakt *R. sanguineus* herbe sa staništa na Iriškom vencu.

Ekstrakti vrste *R. crispus* su takođe ispoljili antimikrobnu aktivnost protiv *A. baumannii* izolata iz rana. Bakteriostatska aktivnost je zabeležena pri MIC vrednostima 1-2 mg mL⁻¹ za oba ekstrakta, dok je baktericidni efekat zabeležen pri nešto višim koncentracijama 1,41-4 mg mL⁻¹ za ekstrakt 171, odnosno 2-5,66 mg mL⁻¹ za ekstrakt 179 (tabela 5.18). Za razliku od biljaka roda *Rumex*, ekstrakti vrste *U. dioica*, kao i biljaka roda *Allium* (*Allium melanantherum*, *Allium fuscum*, *Allium paniculatum* subsp. *marginatum*, *Allium rhodopeum*, *Allium cepa* i *Allium sativum*) nisu ispoljili antibakterijsku aktivnost (>8 mg mL⁻¹) protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana (tabela 5.18).

Tabela 5.18. MIC i MBC vrednosti ekstrakata biljaka *R. sanguineus*, *R. crispus* *U. dioica* i različitih vrsta roda *Allium* protiv *A. baumannii* izolata iz rana

<i>A. baumannii</i> izolati	<i>Rumex sanguineus</i>								<i>Rumex crispus</i>				<i>Urtica dioica</i> *		rod <i>Allium</i> **	
	4NZ_H_p		4NZ_R		4Z_H_p		4Z_R		171		179		dva ekstrakta		šest ekstrakata	
	MIC***	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ATTC 19606	1,41	2,00	1,41	2,83	1,00	2,00	1,41	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
ATCC BAA747	1,41	2,00	1,41	2,83	1,00	2,00	2,00	2,83	1,41	2,00	1,41	2,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
NCTC 13423	2,00	2,00	4,00	5,66	2,00	2,00	2,00	4,00	1,41	2,00	1,41	2,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-2572	2,00	2,83	2,00	4,00	2,00	2,83	2,83	5,66	1,41	2,83	2,00	4,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-2793	2,00	2,83	2,00	4,00	1,00	2,00	2,00	2,83	1,41	2,83	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-4156	2,00	5,66	2,00	4,00	2,00	4,00	2,00	4,00	1,41	2,83	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-4727	1,41	2,00	2,00	2,83	1,00	1,41	2,00	2,83	1,41	2,83	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-4779	1,41	2,83	2,00	2,83	1,00	1,41	1,41	2,83	1,00	1,41	1,41	2,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-4803	1,41	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,41	1,41	1,00	2,00	1,41	2,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-4804	2,83	2,83	2,83	2,83	1,41	1,41	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-4890	1,41	2,00	2,83	4,00	1,00	1,41	2,00	2,83	1,00	2,00	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-4914	2,00	2,83	2,00	4,00	1,00	2,83	2,00	4,00	1,41	2,83	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-5055	1,00	2,83	1,41	2,00	1,00	2,00	1,41	2,83	1,00	2,00	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-5074	2,00	5,66	2,83	5,66	1,41	2,83	2,00	4,00	1,41	4,00	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-5081	2,00	2,83	2,83	4,00	1,00	2,00	2,00	4,00	1,00	2,83	1,00	2,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-5372	2,00	4,00	2,83	4,00	1,41	2,83	2,83	5,66	1,41	2,83	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-6673	1,41	2,00	2,83	4,00	1,00	2,00	2,83	5,66	1,41	2,83	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-7860	2,00	2,83	4,00	4,00	1,00	1,41	2,83	4,00	2,00	2,83	2,00	4,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-8255	2,83	4,00	4,00	5,66	2,00	2,83	2,83	4,00	1,41	4,00	2,00	5,66	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-8781	2,00	4,00	2,00	4,00	1,41	2,83	2,00	4,00	1,41	2,83	2,00	4,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-8833	2,00	2,83	2,00	2,83	1,41	2,00	2,00	2,83	1,41	4,00	2,00	4,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-3496	2,00	4,00	2,00	4,00	1,00	2,83	2,00	4,00	1,00	2,00	1,41	2,83	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Aba-4010	1,41	2,00	1,41	2,83	1,00	2,00	1,41	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,00	1,41	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,41	1,00	2,00	1,00	2,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,00	1,41	2,00	2,00	1,00	1,41	1,00	2,00	0,50	1,00	0,50	1,00	8,00	>8,00	>8,00	>8,00

*Ekstrakti vrste *U. dioica* Ud 9 i Ud 10; ** Ekstrakti roda *Allium* – *A. melanantherum*, *A. fuscum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. rhodopeum*, *A. cepa*, *A. sativum*;

***MIC, minimalna inhibitorna koncentracija, MBC, minimalna bakteriocidna koncentracija, vrednosti su izražene u jedinicama mg mL⁻¹ i predstavljaju geometrijsku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje dva nezavisna ponavljanja

U ovom radu su utvrđene korelacije između osobina *A. baumannii* izolata iz rana i njihove osetljivosti na nekonvencionalne antimikrobne agense (prilog 9.17). Između osetljivosti sojeva na etarska ulja vrste *E. camaldulensis* (EuHN i EuB), odnosno utvrđenih MIC vrednosti za ova ulja i osobine hidrofobnosti ćelija je utvrđena negativna statistički značajna linearna korelacija ($\tau = -0,37$, $P=0,027$; $\tau = -0,474$, $P=0,005$), kao i za osobinu autoagregacije, ali sa etarskim uljem vrste *M. communis* (MyK) ($\tau = -0,34$, $P=0,046$) i bioaktivnom komponentom eugenol ($\tau = -1,0$, $P=0,0$). Stepem trzajuće pokretljivosti je takođe bio u negativnoj statistički značajnoj linearnoj korelaciji sa anti-*A. baumannii* efektom komponente 3-karen ($\tau = -1,0$, $P=0,0$). Za razliku od ovih osobina, osobina produkcije lektina *A. baumannii* ćelija je bila u statistički značajnoj pozitivnoj linearnoj korelaciji sa osetljivošću sojeva na etarska ulja vrsta *Hyssopus officinalis* ($\tau = 0,40$, $P=0,042$) i *Mentha x piperita* ($\tau = 0,50$, $P=0,008$), kao i na komponentu α -pinen ($\tau = 1,0$, $P=0,0$). Osobina sposobnosti produkcije biofilma bila je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa osetljivošću sojeva na etarska ulja vrsta *Salvia officinalis* ($\tau = 0,34$, $P=0,036$), *Melissa officinalis* ($\tau = 0,35$, $P=0,47$), *Rosmarinus officinalis* ($\tau = 0,42$, $P=0,016$), *Achillea millefolium* ($\tau = 0,52$, $P=0,002$), a u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa osetljivošću sojeva na ekstrakt vrste *Rumex sanguineus* (4Z_R) ($\tau = -0,409$, $P=0,016$).

5.3.2. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA BIOFILM *A. baumannii* IZOLATA

Zbog detektovane sposobnosti *A. baumannii* sojeva da formiraju biofilm, utvrđen je efekat koji etarska ulja ostvaruju kako na proces formiranja biofilma, tako i na uklanjanje već formiranog biofilma.

5.3.2.1. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA FORMIRANJE BIOFILMA

Utvrđene inhibitorne koncentracije formiranja biofilma za etarska ulja vrste *M. communis* su iznosila od 2 do $>4 \mu\text{L mL}^{-1}$, dok su za etarska ulja *E. camaldulensis* kretala od 2 do $4 \mu\text{L mL}^{-1}$. Koncentracije etarskog ulja pri kojima su inhibirane planktonske ćelije u medijumu tokom formiranja biofilma su iznosile $1-4 \mu\text{L mL}^{-1}$ za *M. communis*, odnosno $0,5$ do $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ za *E. camaldulensis* (tabela 5.19). Takođe, nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija između MIC vrednosti ovih etarskih ulja i njihovih inhibitornih koncentracija na formiranje biofilma i planktonskih ćelija prisutnih u medijumu tokom ovog procesa (prilog 9.18).

Tabela 5.19. Inhibitorne koncentracije etarskih ulja na formiranje biofilma i planktonske ćelije u medijumu

<i>A. baumannii</i>	MyHN		MyB		MyK		Eu HN		EuB	
	BIC*	PIC	BIC	PIC	BIC	PIC	BIC	PIC	BIC	PIC
ATTC 19606	4	2	4	4	4	4	4	2	4	2
Aba-2572	4	4	2	2	4	4	4	2	2	0,5
Aba-5055	2	2	4	2	4	4	2	1	4	1
Aba-4804	4	2	4	2	4	4	4	2	4	1
Aba-8781	>4	2	2	2	4	2	4	2	4	1
Aba-8833	2	2	4	2	2	1	4	2	2	0,5
Aba-3496	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2
Aba-4010	4	2	4	2	4	2	2	1	4	2

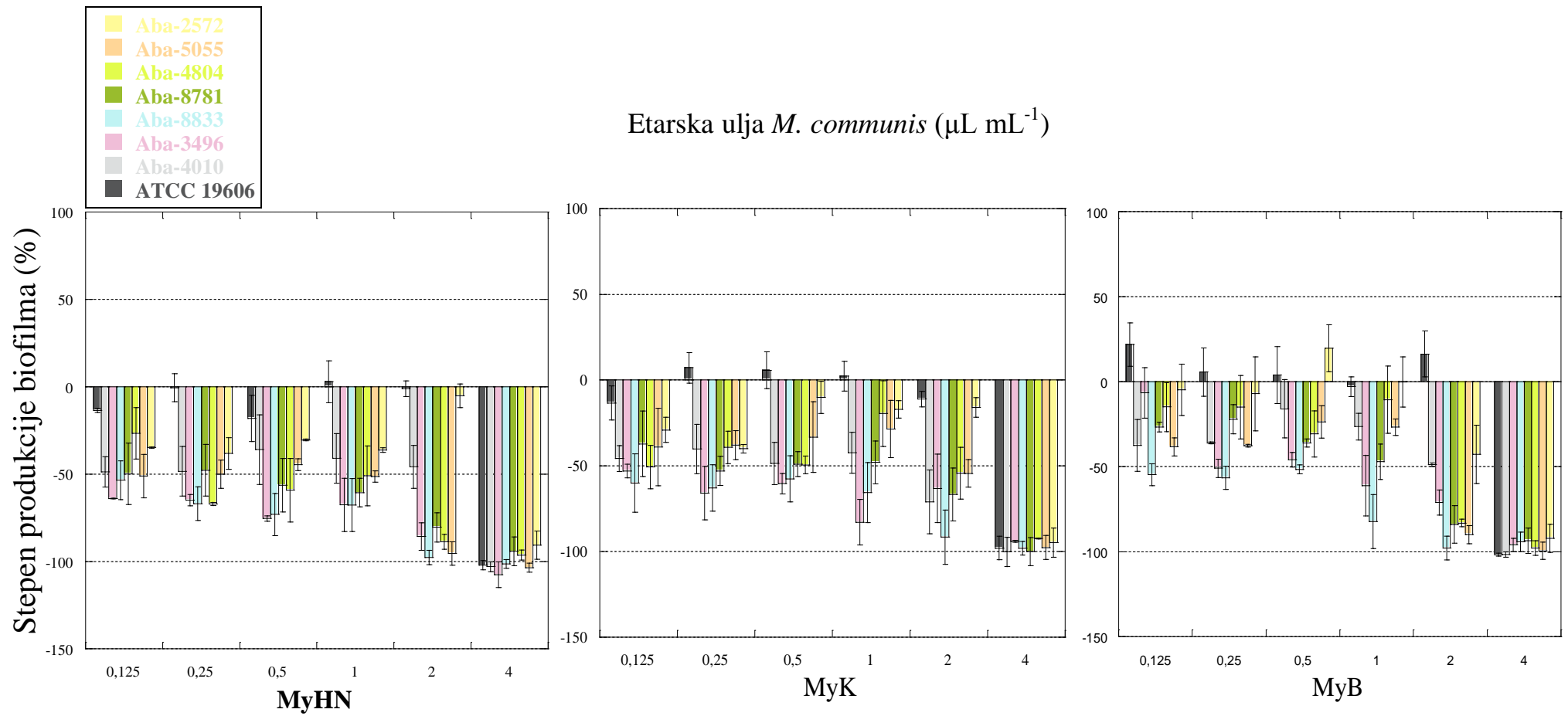
* BIC-biofilm inhibitorna koncentracija ($\mu\text{L mL}^{-1}$); PIC-inhibitorna koncentracija planktonskih ćelija ($\mu\text{L mL}^{-1}$)

Efekat etarskih ulja *M. communis* (MyHN, MyK, MyB) i *E. camaldulensis* (EuHN i EuB) na proces formiranja biofilma osam odabranih *A. baumannii* izolata (Aba-2572, Aba-5055, Aba-4804, Aba-8781, Aba-8833, Aba-3496, Aba-4010 i ATCC19606) prikazan je na grafikonima 5.6 i 5.7. Kao što se sa prikazanih grafikona može uočiti sva ispitivana etarska ulja su ispoljila inhibitorni efekat na proces formiranja biofilma multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata, redukujući stepen produkovanog biofilma. Kao najefikasnije pokazalo se etarsko ulje MyHN, ali i preostala dva etarska ulja ove vrste su inhibirala proces formiranja biofilma, dok su subinhibitorne koncentracije ovih ulja kod nekih sojeva blago stimulisale produkciju biofilma (grafikon 5.6).

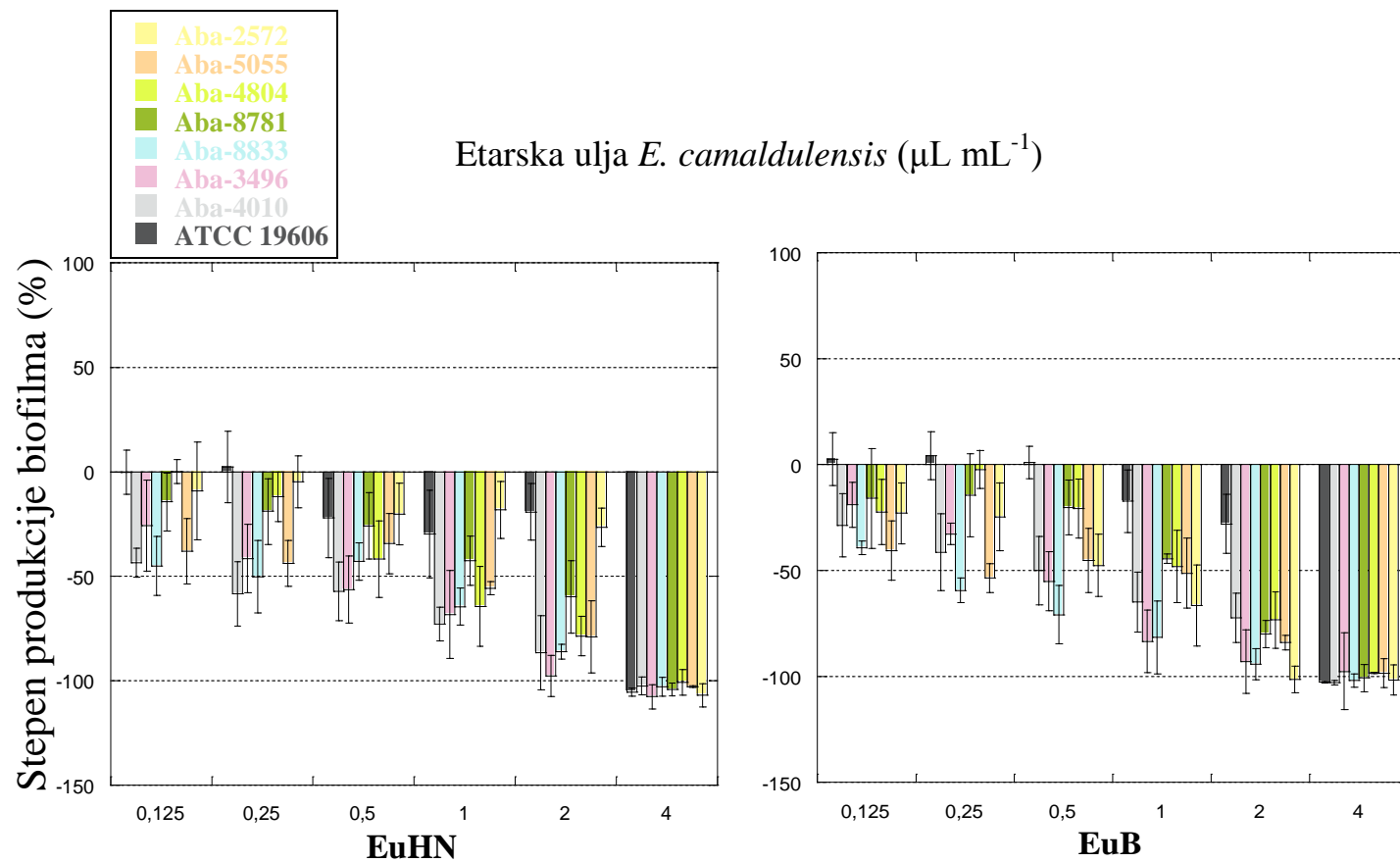
Stepen produkcije biofilma redukovan je za 25-50 % primenom etarskih ulja vrste *M. communis* već pri koncentraciji $0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$ i to kako kod lošijih tako i kod dobrih producenata biofilma testiranih *A. baumannii* izolata iz rana. Pri koncentracijama $2-4 \mu\text{L mL}^{-1}$ stepen redukcije bio je najveći (60-100 %). Redukcija formiranja biofilma primenom etarskih ulja MyHN i MyK u koncentraciji od $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ iznosila je 80-95 % za MyHN, odnosno 55-92 % za MyK, osim za soj Aba-2572 koji je bio najrezistentniji na oba etarska ulja, dok je pri koncentraciji $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ formiranje biofilma redukivano 90-100 % primenom oba ulja. U prisustvu etarskog ulja MyB detektovan je veći stepen redukcije formiranja biofilma kod svih izolata. Pri koncentraciji $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ formiranje biofilma redukivano je za 43-98 %, a pri koncentraciji $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ za 92-100 %.

Kada su etarska ulja *E. camaldulensis* korišćena u koncentraciji $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ formiranje biofilma smanjeno je za 18-73 % primenom EuHN, odnosno za 21-83 % primenom EuB, i protiv šest testiranih *A. baumannii* izolata iz rana, osim sojeva Aba-2572 i ATCC 19606 (grafikon 5.7). Pri koncentraciji od $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ redukcija produkovanog biofilma je iznosila 28-100 % za EuHN, odnosno 20-98 % za etarsko ulje EuB. Primenom najviše testirane koncentracije ($4 \mu\text{L mL}^{-1}$), etarsko ulje *E. camaldulensis* sa lokaliteta Herceg Novi je redukovalo formiranje biofilma za 97,6-100 %, dok se etarsko ulje sa lokaliteta Bar pokazalo kao još efikasnije redukujući produkciju biofilma u potpunosti kod svih testiranih MDR *A. baumannii* izolata iz rana.

Etarska ulja *M. communis* ($\mu\text{L mL}^{-1}$)



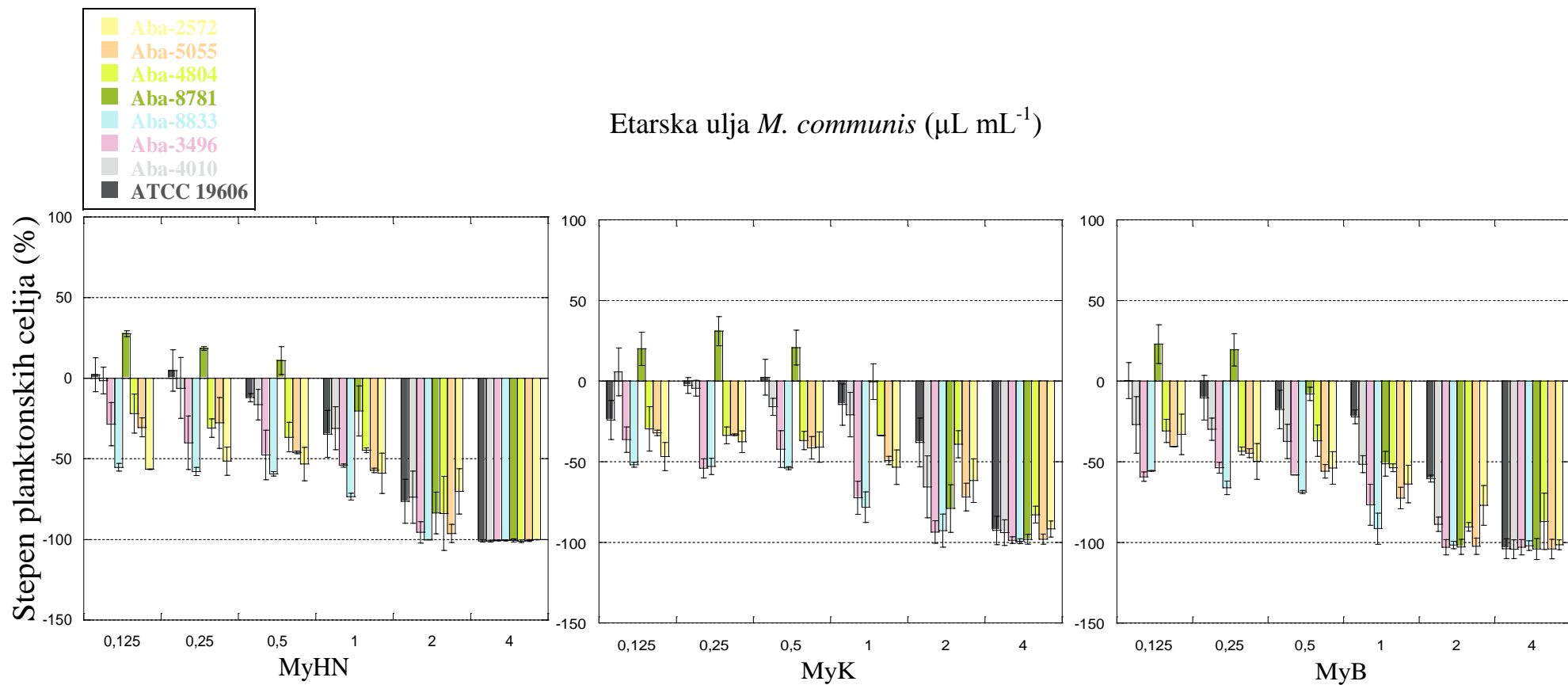
Grafikon 5.6. Efekat etarskih ulja *M. communis* (MyHN, MyK i MyB) na proces formiranja biofilma odabranih *A. baumannii* izolata



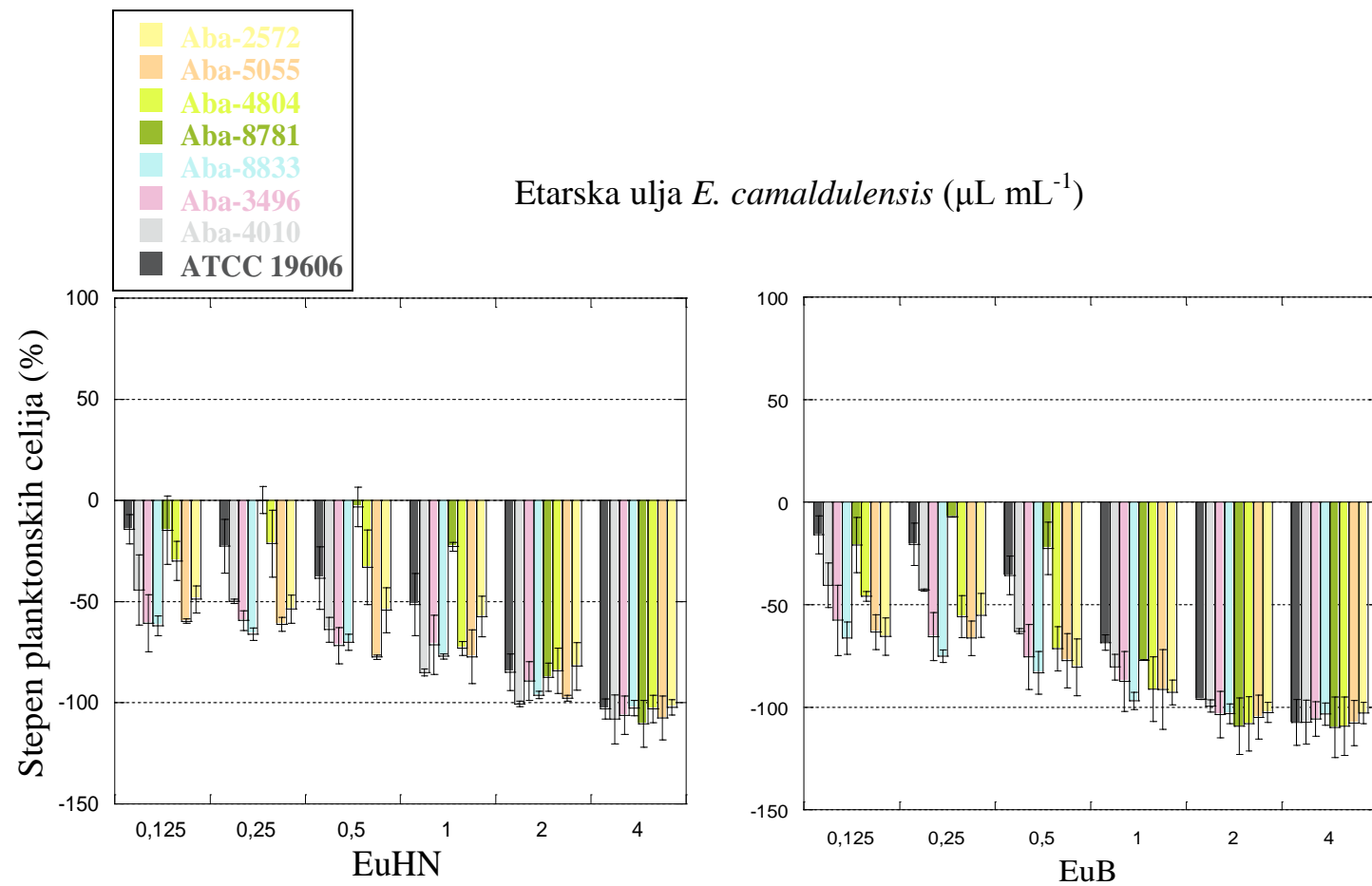
Grafikon 5.7. Efekat etarskih ulja *E. camaldulensis* (EuHN i EuB) na proces formiranja biofilma odabranih *A. baumannii* izolata

Efekat etarskih ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* sa različitih lokaliteta, na planktonske ćelije u medijumu tokom formiranja biofilma osam odabranih *A. baumannii* izolata (Aba-2572, Aba-5055, Aba-4804, Aba-8781, Aba-8833, Aba-3496, Aba-4010 i ATCC19606) prikazan je na grafikonima 5.8 i 5.9. Uticaj etarskih ulja na planktonske ćelije u toku formiranja biofilma je bio još izraženiji, jer je pri nižim koncentracijama došlo do značajne redukcije njihove brojnosti kod većine *A. baumannii* izolata. Primenom etarskog ulja *M. communis* sa lokaliteta Herceg Novi redukcija planktonskih ćelija u medijumu je već pri koncentraciji $0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$ za iznosila 20-56 %, dok je pri koncentraciji $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ prisustvo planktonskih ćelija u medijumu redukovano za 20-73 % (grafikon 5.8). Primenom većih koncentracija istog etarskog ulja redukcija je iznosila 70-100 % pri koncentraciji $2 \mu\text{L mL}^{-1}$, dok je brojnost planktonskih ćelija u medijumu tokom formiranja biofilma pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji etarskog ulja MyHN potpuno redukovana. Redukcija brojnosti planktonskih ćelija u medijumu primenom etarskog ulja MyK pri koncentraciji od $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ iznosila je 38-93,5 %, a pri koncentraciji $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ planktonske ćelije su inhibirane 83-99 %. Dobar efekat u redukciji planktonskih ćelija tokom formiranja biofilma ispoljilo je i etarsko ulje MyB koje je pri koncentraciji $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ redukovalo brojnost planktonskih ćelija za 17,5-69 % kod tri *A. baumannii* izolata (osim za soj Aba-8781 8 %). U koncentraciji od $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ ovo etarsko ulje je redukovalo rast 22-91 % planktonskih ćelija u medijumu prilikom formiranja biofilma. Primenom većih koncentracija etarskog ulja MyB stepen redukcije je iznosio 60-100 % pri koncentraciji $2 \mu\text{L mL}^{-1}$, dok je pri koncentraciji $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ ovo ulje, kao i etarsko ulje MyHN, u potpunosti redukovalo rast planktonskih ćelija u medijumu tokom formiranja biofilma.

Etarska ulja vrste *E. camaldulensis*, kao i u procesu formiranja biofilma, su ispoljila dobar efekat inhibicije planktonskih ćelija u medijumu tokom ovog procesa, potpuno redukujući njihovu brojnost (100 %) pri koncentraciji od $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ (grafikon 5.9). Primenom koncentracije $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ etarskog ulja EuHN planktonske ćelije u medijumu tokom formiranja biofilma su redukovane za 82-100 %, odnosno 96-100 % za etarsko ulje EuB. Etarska ulja u koncentraciji od $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ su takođe postigla značajan efekat redukujući planktonske ćelije za 85-97,3 % primenom EuHN (osim za soj Aba-8781 – 23 %), odnosno 68,5-93 % primenom EuB. Bitno je napomenuti da su etarska ulja *E. camaldulensis* ispoljila dobar efekat koji je zabežen i pri koncentraciji od $0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$, gde je redukcija rasta planktonskih ćelija u medijumu prilikom formiranja biofilma iznosila 15-66 % kod svih ispitivanih MDR *A. baumannii* izolata.



Grafikon 5.8. Efekat etarskih ulja *M. communis* (MyHN, MyK i MyB) na planktonske ćelije u medijumu tokom formiranja biofilma odabranih *A. baumannii* izolata



Grafikon 5.9. Efekat etarskih ulja *E. camaldulensis* (EuHN i EuB) na planktonske ćelije u medijumu tokom formiranja biofilma odabranih izolata *A. baumannii*

5.3.2.2. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA FORMIRANI BIOFILM

Utvrđene koncentracije potrebne za uklanjanje formiranog biofilma starog 24 h iznosile su 2 do >4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis*. Kao najefikasnija ulja u uklanjanju biofilma prema utvrđenim BEC vrednostima pokazala su se ulja MyHN i EuB. Koncentracije etarskog ulja pri kojima su inhibirane planktonske ćelije u medijumu iznad biofilma su iznosile 1-2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za *M. communis*, odnosno 1-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za *E. camaldulensis*, a kao najefikasnije se pokazalo ulje EuB (Tabela 5.20). Takođe, nije utvrđena, statistički značajna linearna korelacija između MIC vrednosti ovih etarskih ulja i njihovih koncentracija efikasnih u uklanjanju već formiranog biofilma i planktonskih ćelija u medijumu iznad njega (prilog 9.18).

Tabela 5.20. Koncentracije uklanjanja biofilma i planktonskih ćelija u medijumu iznad njega

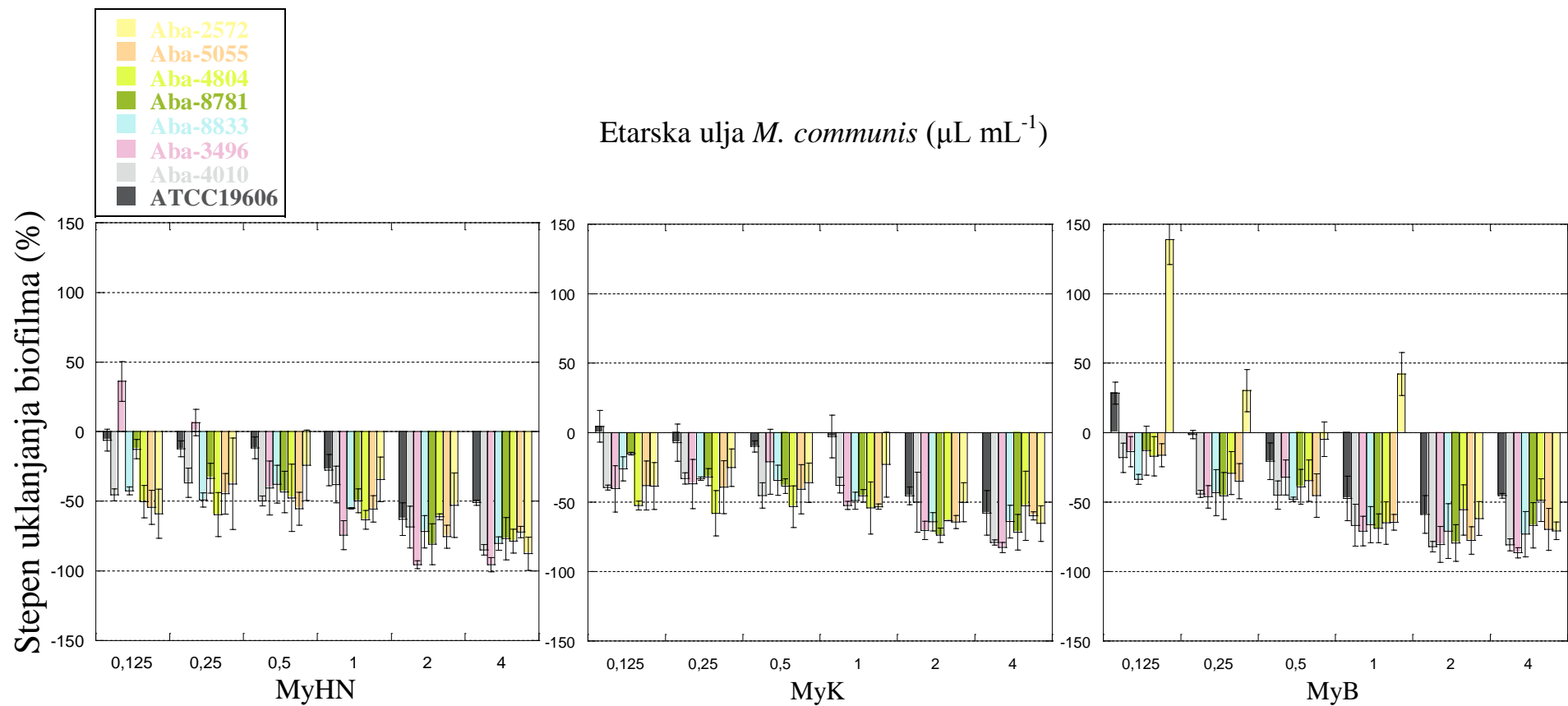
<i>A. baumannii</i>	MyHN		MyB		MyK		Eu HN		EuB	
	BEC*	PEC	BEC	PEC	BEC	PEC	BEC	PEC	BEC	PEC
ATTC 19606	>4	2	>4	1	>4	2	>4	4	>4	1
Aba-2572	2	2	4	2	4	2	4	2	2	1
Aba-5055	>4	2	>4	2	>4	2	>4	2	>4	1
Aba-4804	>4	2	>4	2	>4	2	>4	2	>4	1
Aba-8781	>4	2	>4	1	>4	2	>4	1	>4	1
Aba-8833	>4	2	>4	1	>4	2	>4	2	>4	1
Aba-3496	2	2	4	1	2	2	4	2	2	1
Aba-4010	2	2	4	1	4	2	>4	2	2	1

*BEC- koncentracija uklanjanja biofilma (eng. *biofilm eradication concentration*) ($\mu\text{L mL}^{-1}$), PEC-koncentracija uklanjanja planktonskih ćelija (eng. *planktonic cells eradication concentration*) ($\mu\text{L mL}^{-1}$)

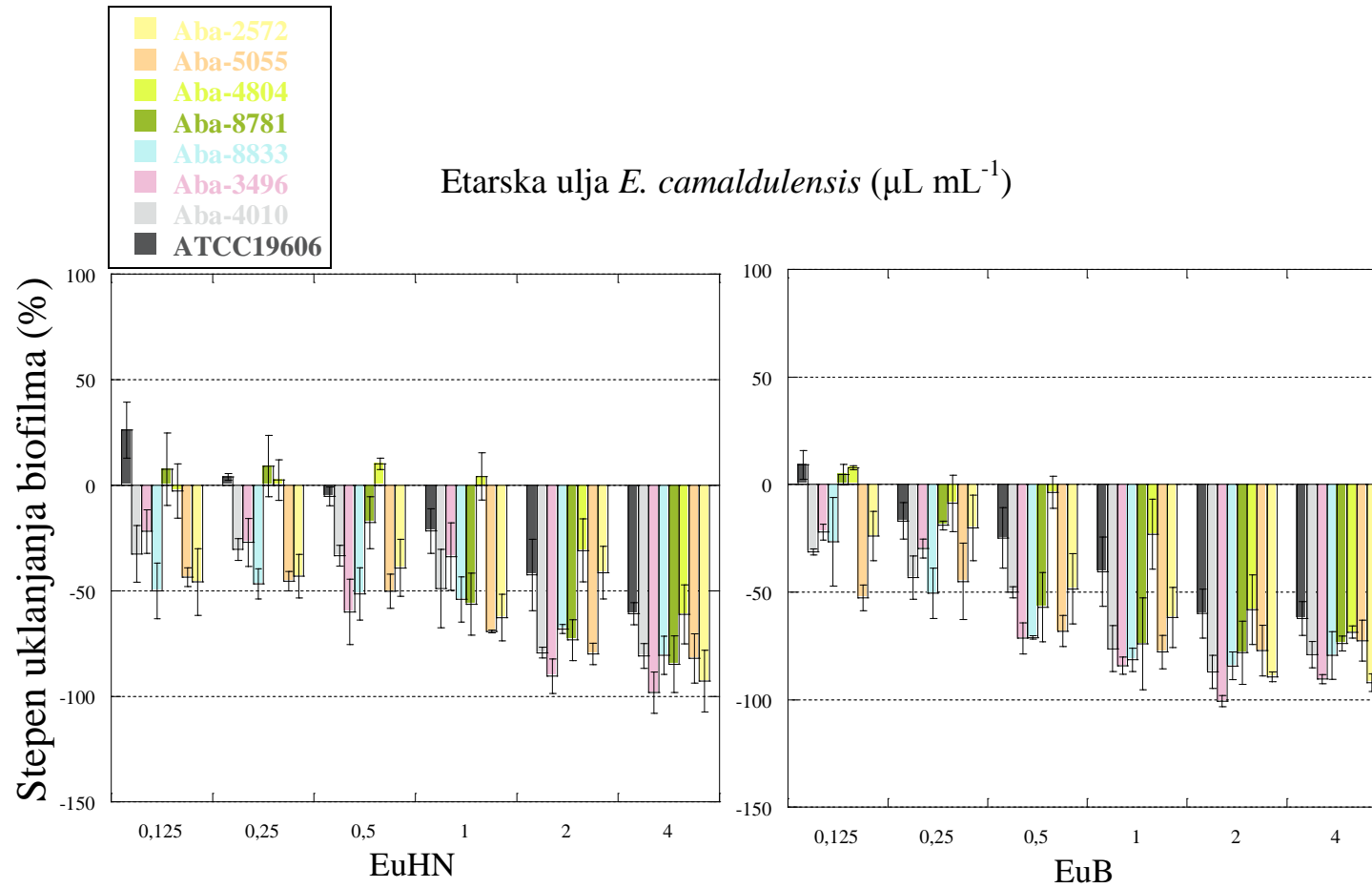
Efekat tri etarska ulja *M. communis* i dva etarska ulja *E. camaldulensis* na uklanjanje formiranog, dvadesetčetiri časa starog biofilma osam odabranih *A. baumannii* izolata (Aba-2572, Aba-5055, Aba-4804, Aba-8781, Aba-8833, Aba-3496, Aba-4010 i ATCC19606) prikazan je na grafikonima 5.10 i 5.11. Jasno se može uočiti da su sva ispitivana etarska ulja ispoljila sposobnost uklanjanja formiranog biofilma, ali u različitoj meri i u zavisnosti od bakterijskog izolata. Pri nižim koncentracijama etarskih ulja vrste *M. communis*, uklonjeno je do 59 % formiranog biofilma. Međutim, kod nekih sojeva detektovan je porast biomase biofilma nakon delovanja subinhibitornih koncentracija etarskog ulja. Etarsko ulje MyHN je ovaj efekat postiglo kod soja Aba-3496, gde je stepen biofilma uvećan za 36 % pri koncentraciji 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ i 6,5 % pri koncentraciji 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Etarska ulja MyK i MyB su isti efekat ostvarila u koncentraciji 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ na soj ATCC 19606, a količina biofilma uvećana je za 4,5 % i 28,4 %, redom. Najveće uvećanje stepena biofilma od 138,8 % detektovano je kada je etarsko ulje MyB primenjeno na soj Aba-2572 u koncentraciji 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Međutim, pri koncentraciji 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ uklonjeno je 23-74 % formiranog biofilma, dok je pri koncentracijama 2 i 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ taj procenat bio viši. Primenom etarskog ulja MyHN u koncentraciji 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ uklonjeno je 53-96 % biofilma, a u koncentraciji 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ovo ulje je uklonilo čak 77-95,5 % formiranog biofilma, zavisno od bakterijskog soja.

Etarska ulja MyK i MyB su ispoljila nešto slabiji efekat, jer su pri koncentraciji $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ uklonila su 45-82 %, a pri dvostruko većoj koncentraciji 45-86 % formiranog biofilma.

Etarska ulja vrste *E. camaldulensis* su ispoljila veoma dobar efekat na uklanjanje biofilma *A. baumannii*. Pri koncentraciji $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ etarsko ulje EuB je uklonilo 58-100 % biofilma, odnosno 73-98 % pri koncentraciji $4 \mu\text{L mL}^{-1}$. Subinhibitorne koncentracije ($0,5$ i $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$) ovog etarskog ulja su takođe uzrokovale smanjenje formiranog biofilma za 4-71 %. Najniža testirana koncentracija ($0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$) je uticala na smanjenje biofilma za 22-53 % (grafikon 5.11). Sposobnost uklanjanja formiranog biofilma posedovalo je i etarsko ulje EuHN koje je pri koncentracijama 2 i $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ uklonilo 30-98 % biofilma. Međutim, ovo ulje je takođe u subinhibitornim koncentracijama uzrokovalo povećanje stepena biofilma kod tri izolata. Stepenn biofilma Aba-4804 je uvećan 2,5-10,2 % pri subinhibitornim koncentracijama EuHN ($0,125$ - $1 \mu\text{L mL}^{-1}$), dok je kod izolata Aba-8781 pri koncentracijama $0,125$ i $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ uvećanje iznosilo 7,7-9,1 %. Povećanje stepena biofilma je osim kod dva soja, koja su okarakterisana kao dobri producenti biofilma, zabeležno i kod soja ATCC 19606 za 26 % pri $0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$ i 4 % pri $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ etarskog ulja EuHN (grafikon 5.11).



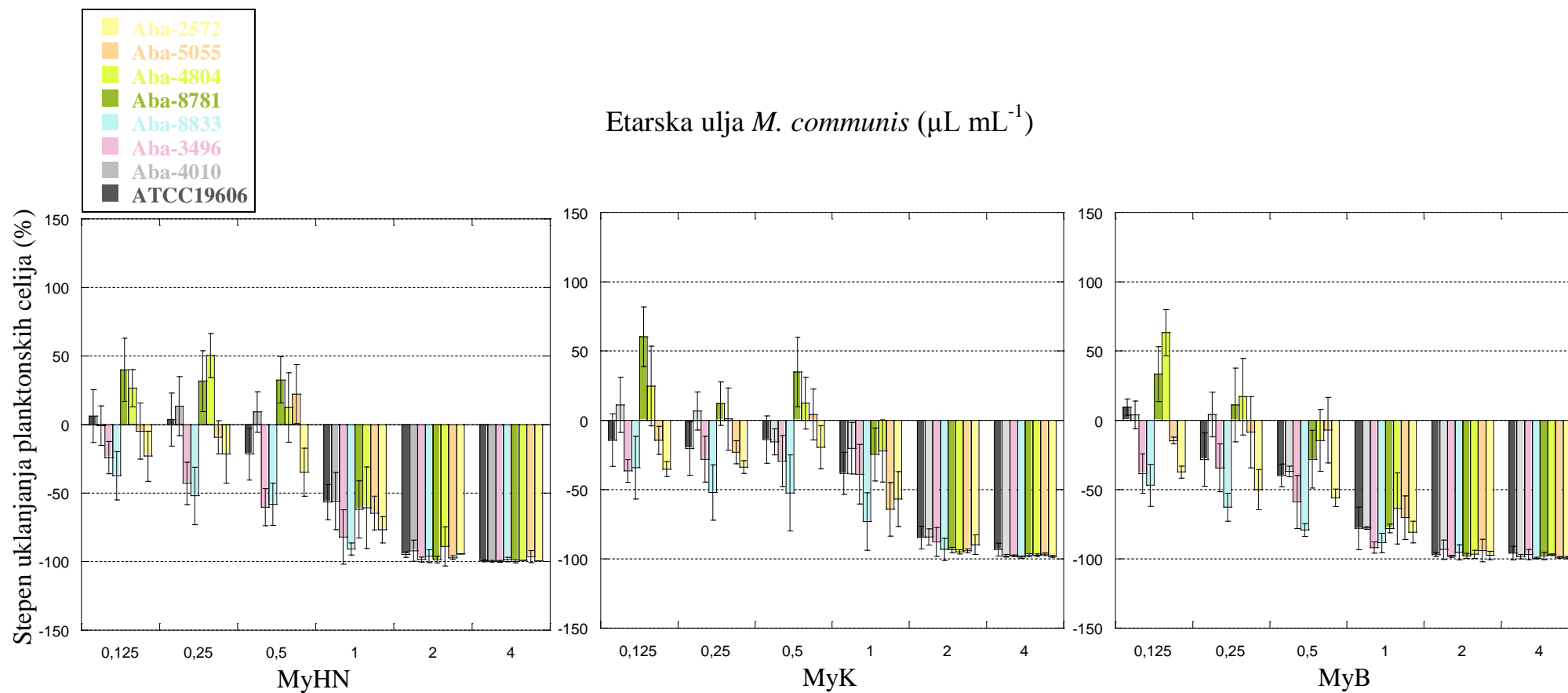
Grafikon 5.10. Efekat etarskih ulja *M. communis* (MyHN, MyK i MyB) na formirani biofilm odabranih *A. baumannii* izolata



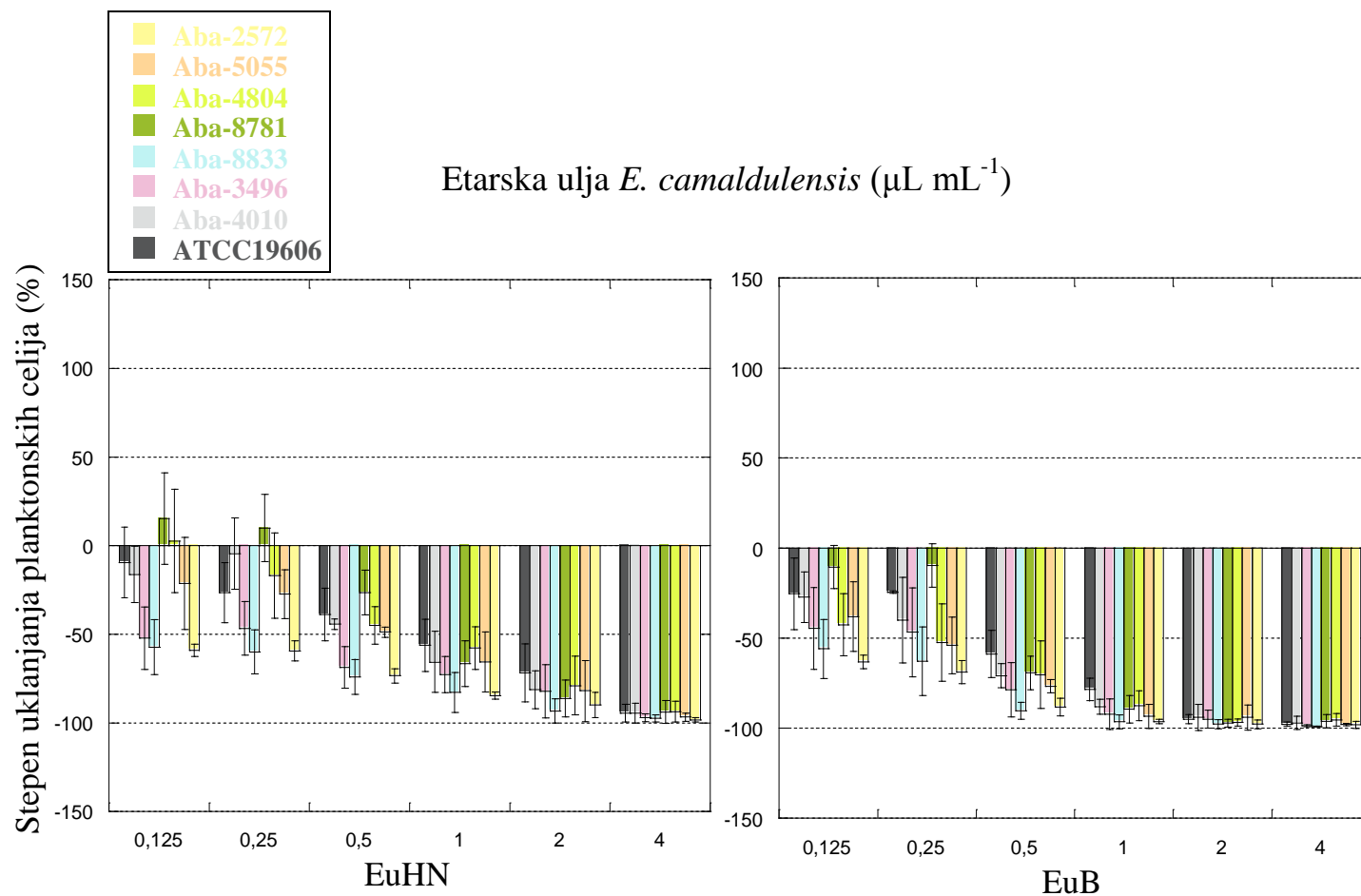
Grafikon 5.11. Efekat etarskih ulja *E. camaldulensis* (EuHN i EuB) na formirani biofilm odabranih *A. baumannii* izolata

Efekat etarskih ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* na planktonske ćelije u medijumu iznad već formiranog biofilma odabranih *A. baumannii* izolata (Aba-2572, Aba-5055, Aba-4804, Aba-8781, Aba-8833, Aba-3496, Aba-4010 i ATCC19606) prikazan je na grafikonima 5.12 i 5.13. Planktonske ćelije u medijumu iznad formiranog biofilma su u velikoj meri inhibirane etarskim uljima vrste *M. communis* kada su primenjena u koncentracijama 1-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Pri koncentraciji 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ulje MyHN je uklonilo 55,8-90,8 %, ulje MyK 20,1-73 %, a ulje MyB 63,5-91,8 % planktonskih ćelija. Pri koncentracijama 2 i 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ etarsko ulje MyHN je uklonilo 88,8-99,9 %, ulje MyK 84,1-98,7 %, a ulje MyB 93,3-99,4 % planktonskih ćelija (grafikon 5.12). Međutim, subinhibitorne koncentracije ovih etarskih ulja kod pojedinih izolata, naročito izolata okarakterisanih kao dobri producenti biofilma, uzrokovale su povećanje rasta planktonskih ćelija u medijumu iznad formiranog biofilma. Etarsko ulje MyHN je u subinhibitornim koncentracijama uklonilo planktonske ćelije za 0,5-60,0 %, ali je kod sojeva Aba-4804, Aba-8781 i ATCC 19606 takođe uzrokovalo povećanje koje se kretalo u opsegu 3,7-50,4 %. Takođe, etarsko ulje MyK je u subinhibitornim koncentracijama uklonilo planktonske ćelije u medijumu iznad biofilma za 13,9-52,4 %, ali je kod sojeva Aba-4804, Aba-8781 i Aba-4010 uzrokovalo povećanje koje se kretalo u opsegu 0,9-60,2 %. Etarsko ulje MyB je u koncentracijama 0,125-0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ uklonilo planktonske ćelije za 7,1-79,2 %, ali je kod četiri soja (Aba-4804, Aba-8781, Aba-4010 i ATCC 19606) uticalo na povećan rast planktonskih ćelija iznad biofilma koji se kretao u opsegu 4-63,2 %.

Etarska ulja vrste *E. camaldulensis* su se pokazala kao veoma efikasna i u uklanjanju planktonskih ćelija iznad formiranog biofilma. Planktonske ćelije u medijumu iznad formiranog biofilma su u velikoj meri uklonjene pri koncentracijama 0,5-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, čak je etarsko ulje EuB pri koncentraciji 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ uklonilo više od 50 % planktonskih ćelija (grafikon 5.13). Takođe, ovo etarsko ulje je za razliku od ostalih testiranih ulja i pri subinhibitornim koncentracijama uklonilo planktonske ćelije iznad biofilma za 9,7-68,9 %. Međutim, etarsko ulje EuHN je pri subinhibitornim koncentracijama uklonilo ove ćelije za 4,5-59,9 %, ali je i kod soja Aba-4804 u koncentraciji 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ uvećalo njihovo prisustvo za 2,7 %, dok je kod soja Aba-8781 u koncentraciji 0,125-0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ uvećanje rasta planktonskih ćelija iznad formiranog biofilma iznosilo 10-15,3 % (grafikon 5.13).



Grafikon 5.12. Efekat etarskih ulja *M. communis* (MyHN, MyK i MyB) na planktonske ćelije u medijumu iznad formiranog biofilma odabranih *A. baumannii* izolata

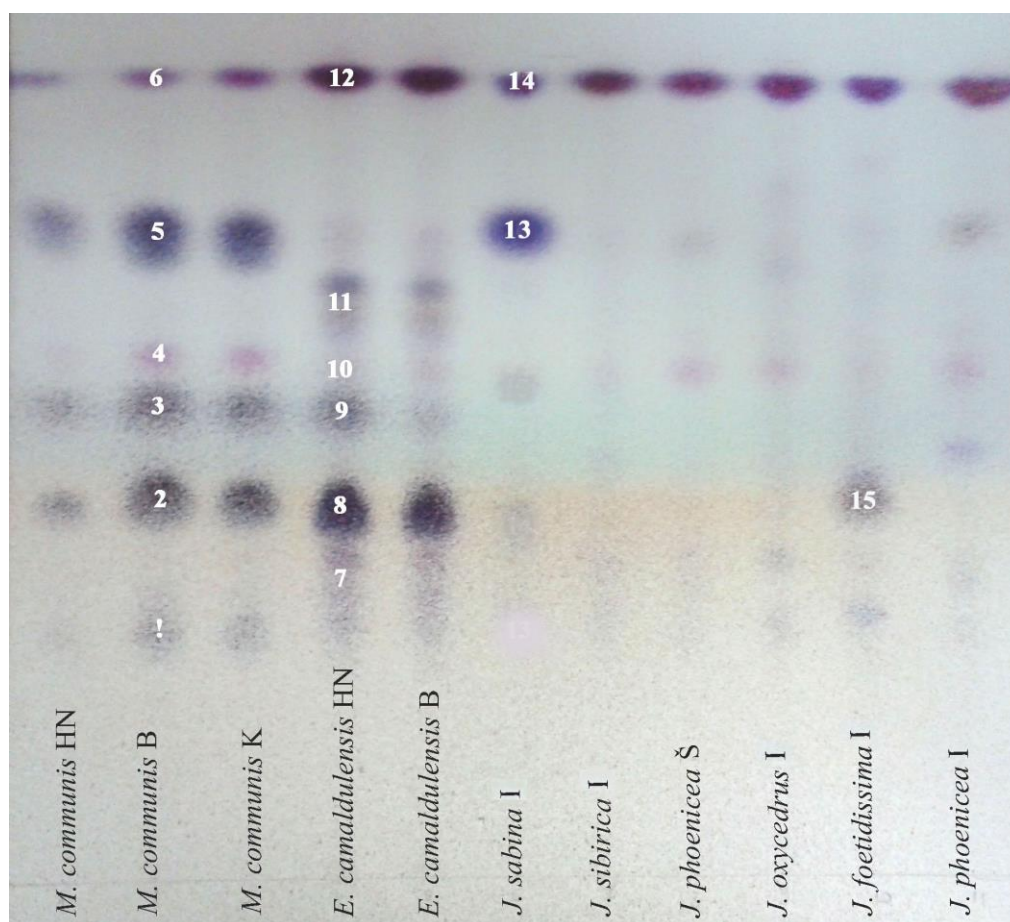


Grafikon 5.13. Efekat etarskih ulja *E. camaldulensis* (EuHN i EuB) na planktonske ćelije u medijumu iznad formiranog biofilma odabranih *A. baumannii* izolata

5.3.3. BIOAUTOGRAFIJA ETARSKIH ULJA I BILJNIH EKSTRAKATA

Za razdvajanje komponenti etarskih ulja, preliminarnu identifikaciju razdvojenih komponenti, kao i identifikaciju komponenti koje poseduju antimikrobnu aktivnost korišćena je bioautografska metoda na TLC aluminijumskim pločama presvučenim silika-gelom. Uporedo su razvijane tri ploče u sistemu razvijачa toluen-etilacetat (93:7). Jedna je prskana reagensom za izazivanje boje (vanilin-sumporna kiselina), a druge dve su korišćene za utvrđivanje antibakterijskog efekta. Identifikacija komponenti sa antimikrobnom aktivnošću vršena je poređenjem obojenog hromatograma sa hromatogramom na kome je praćen bakterijski rast.

Na slici 5.9 prikazan je obojeni TLC hromatogram 11 različitih uzoraka etarskih ulja: tri vrste *M. communis* (Herceg Novi, Bar i Kotor), dva vrste *E. camaldulensis* (Herceg Novi i Bar) i šest etarskih ulja vrsta roda *Juniperus*. Kao što se može videti sa hromatograma etarska ulja su veoma bogata terpenskim jedinjenjima. Razlika u kvalitativnom sastavu etarskih ulja istih vrsta sa različitih lokaliteta na TLC ploči nije uočena.



Slika 5.9. Hromatogram etarskih ulja
(HN-Herceg Novi, B-Bar, K-Kotor, I-iglice, Š-šišarke)

Na hromatogramu se mogu uočiti karakteristične mrlje (slika 5.9). Poređenjem boje mrlja i Rf vrednosti sa literaturnim podacima (Wagner i Bladt, 2001), preliminarno su identifikovane dominantne terpeneske komponente u etarskim uljima (tabela 5.21). U etarskim uljima *M. communis* sa Crnogorskog primorja identifikovani su α -terpineol (mrlja 1), linalol (mrlja 2), 1,8-cineol (mrlja 3), metil eugenol (mrlja 4), grupa acetilovanih monoterpenskih alkohola (mirtenil-acetat, linalil-acetat, geranil-acetat, α -terpinil-acetat, neril-acetat) (mrlja 5) i α -pinen (mrlja 6). U etarskim uljima *E. camaldulensis* takođe sa Crnogorskog primorja sa hromatograma i iz tabele 5.21 može su uočiti da su prisutne polarne terpeneske komponente (mrlja 7), spatulenol (mrlja 8), oksidovani monoterpeni, 1,8-cineol (mrlja 9) i timol (mrlja 10), verovatno kripton (mrlja 11) i terpeneski ugljovodnonici (mrlja 12).

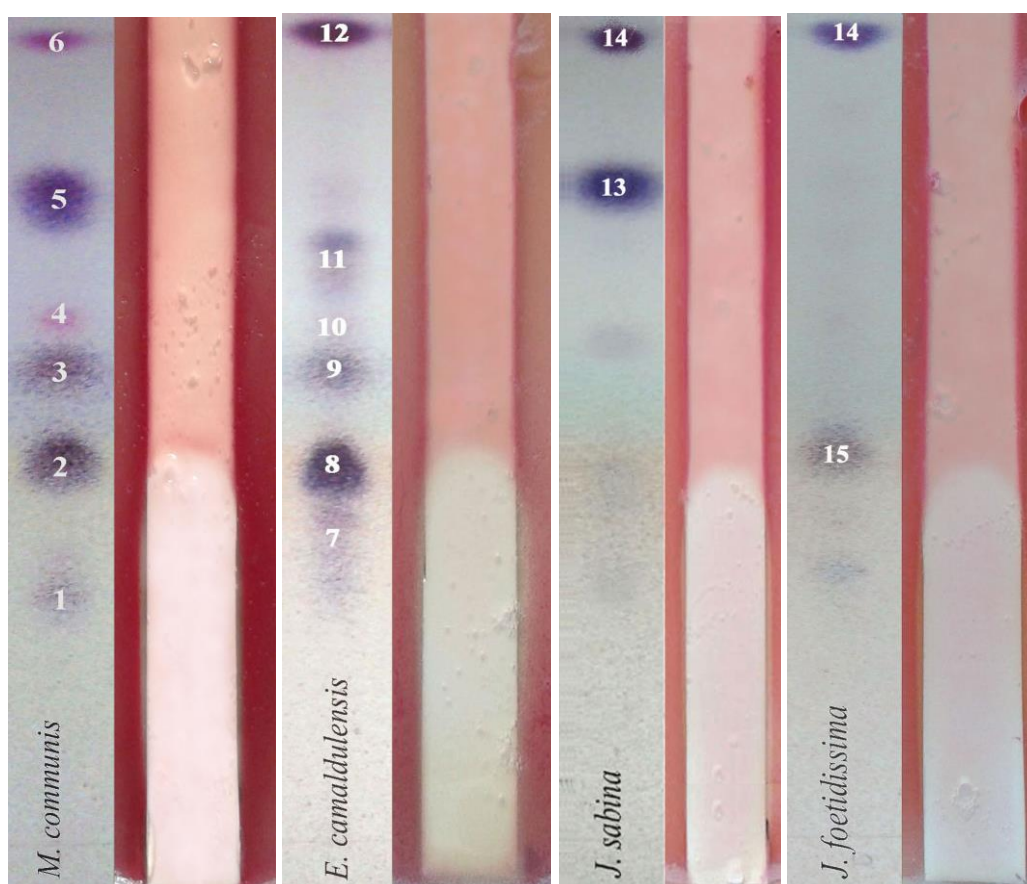
Prema literaturnim podacima (Wagner i Bladt, 2001) kod etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* identifikovana je jedna komponenta i jedna grupa terpeneskih jedinjenja. Kod svih etarskih ulja ovog roda pri vrhu hromatograma detektovana je grupa terpeneskih ugljovodnonika. U etarskom ulju iglica vrste *J. sabina* jasno su uočljive mrlja 13 koja nije identifikovana, kao i mrlja 14 koja predstavlja terpeneske ugljovodnonike. Na hromatogramu etarskog ulja iglica vrste *J. foetidissima* je osim terpeneskih ugljovodnonika identifikovana komponenta 4-terpineol (mrlja 15).

Tabela 5.21. Komponente etarskih ulja identifikovane na TLC hromatogramu

Mrlja na TLC ploči	Komponenta	Rf vrednost	Boja
1	α -terpineol	0,28	plava
2	linalol	0,44	tamno plava
3 i 9	1,8-cineol	0,52	plava
4	metil-eugenol	0,63	ljubičasta
5	acetilovani monoterpeneski alkoholi	0,77	plava
6	α -pinen	0,96	ljubičasta
7	polarne terpeneske komponente	0,25-0,35	svetlo plava
8	spatulenol	0,42	tamno plava
10	timol	0,58	ljubičasta
11	verovatno kripton	0,68	tamno plava
12 i 14	terpeneski ugljovodnonici	0,93-0,96	ljubičasta
13	nije identifikovano	0,79	plava
15	4-terpineol	0,45	svetlo plava

Detekcija komponenti etarskih ulja koje inhibiraju rast bakterijskih ćelija *A. baumannii* prikazana je na slici 5.10. Naizmenično su prikazane trake obojenog TLC-hromatograma i trake na kojima je praćen ćelijski rast. Sa slike se jasno može uočiti da su antibakterijski efekat kod svih ispitivanih ulja ispoljile komponente u donjoj polovini hromatograma, što u korišćenom sistemu razvijaa odgovara polarnim terpeneskim komponentama.

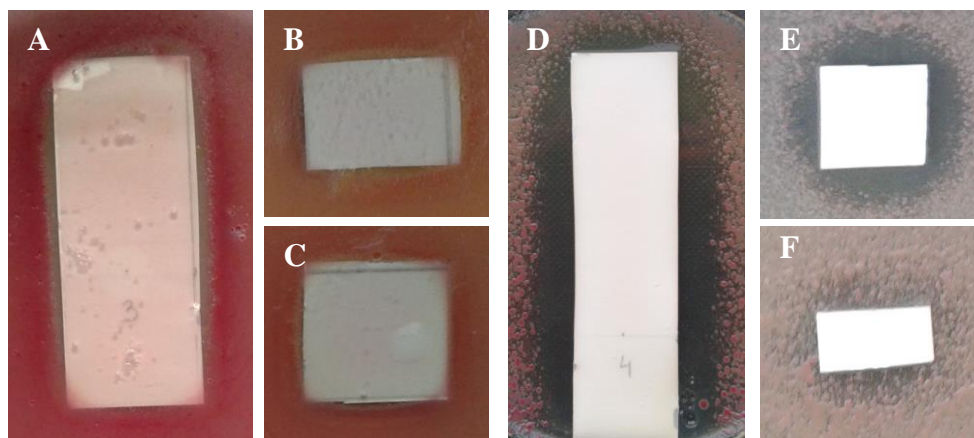
Sa slike 5.10 jasno se može uočiti da je kod etarskih ulja vrste *M. communis* inhibicija bakterijskog rasta postignuta u zoni mrlja 1 i 2, odnosno antibakterijski efekat ispoljile su komponente α -terpineol i linalol. Za etarska ulja vrste *E. camaldulensis* antibakterijski efekat su ispoljile komponente iz grupe terpenkih alkohola i seskviterpen spatulenenol. Kod etarskih ulja biljaka roda *Juniperus* komponente grupe terpenkih alkohola su takođe ispoljile aktivnost. Antibakterijski efekat komponenti ostalih hemijskih grupa nije detektovan bioautografskom analizom kada su testirane sve komponente pojedinačnih etarskih ulja na TLC traci. Međutim, kada su testirane pojedinačne komponente (mrlje), dobijene bioautografskom metodom kao i trake, rezultati su preciznije pokazali koje komponente poseduju antibakterijsku aktivnost i koje su shodno tome odgovorne za antibakterijsku aktivnost testiranog etarskog ulja.



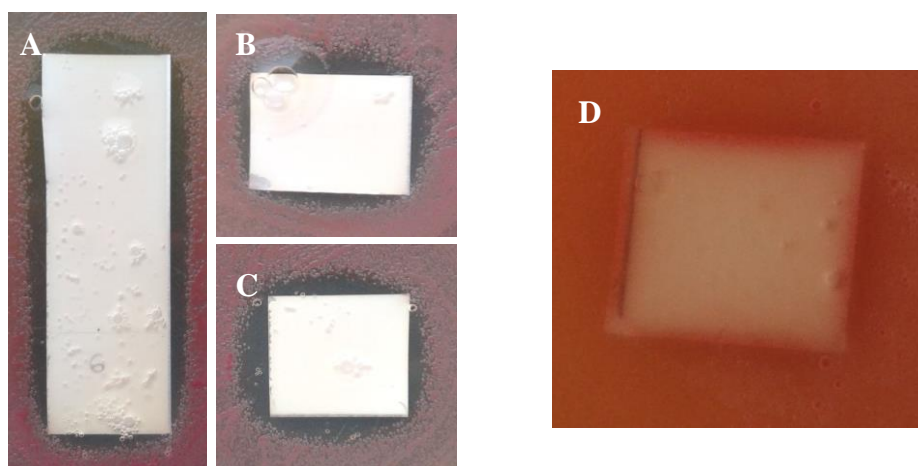
Slika 5.10. Bioautografska analiza efekta komponenti odabranih etarskih ulja na inhibiciju rasta *A. baumannii* ATCC 19606

Na slici 5.11 se može uočiti da su za antibakterijsku aktivnost etarskih ulja odgovorni polarniji monoterpeni i to kod etarskih ulja *M. communis* α -terpineol i linalol, dok su kod etarskih ulja *E. camaldulensis* ovu aktivnost posedovali monoterpeni i seskviterpeni alkoholi (spatulenenol), kao i druge polarnije komponente. Ciklični monoterpeni etar, 1,8-cineol (mrlja 3 i 9), čije je prisustvo detektovano u etarskim uljima obe vrste, nije ispoljio

antimikrobnu aktivnost. Kod etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* antimikrobna aktivnost je detektovana za oksidovane monoterpene, alkohole, aldehide i ketone (slika 5.12).



Slika 5.11. Efekat komponenti etarskih ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* (A i D-polarne terpenске komponente, B-mrlja 1 (α -terpineol), C-mrlja 2 (linalol), E-mrlja 7 (polarne terpenске komponente), F-mrlja 8 (spatulenol))



Slika 5.12. Efekat komponenti etarskog ulja biljne vrste *Juniperus sabina* i komponente etarskog ulja koja ne poseduje antimikrobni efekat (A, B i C-polarne terpenске komponente, D-mrlja 3 i 9 (1,8 cineol))

TLC hromtografijom nije bilo moguće identifikovati dominantne komponente biljnih ekstrakata vrste *R. sanguineus*. Bioautografska analiza ovih biljnih ekstrakata je pokazala da cela TLC traka ne poseduje antimikrobnu aktivnost protiv referentnog soja ATCC 19606, a takođe ni bioautografijom pojedinačnih komponenti ovih ekstrakata nije detektovana njihova antibakterijska aktivnost.

5.3.4. EFEKAT BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENTI NEKONVENCIONALNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA NA *A. baumannii* IZOLATE

Antibakterijska aktivnost četiri biološki aktivne komponente biljnih ekstrakata: kvercetin, katehin, cimetna kiselina i emodin nije detektovana, jer su MIC i MBC vrednosti bioaktivnih supstanci bile veće od maksimalnih ispitivanih ($256 \mu\text{g mL}^{-1}$) (rezultati nisu prikazani).

Za razliku od bioaktivnih komponenti ekstrakata, biološki aktivne komponente etarskih ulja su u različitoj meri posedovale antibakterijsku aktivnost protiv *A. baumannii* izolata (tabela 5.22). Komponente α -teprinen, γ -terpinen i terpinolen nisu ispoljile anti-*A. baumannii* aktivnost čak ni pri koncentraciji $32000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Umerenu antibakterijsku aktivnost posedovale su terpeneske komponente α -pinen (2000 - $3364 \mu\text{g mL}^{-1}$), (R)-(+)-limonen (4757 - $6727 \mu\text{g mL}^{-1}$), 3-karen (1682 - $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$) i sabinen (856 - $1290 \mu\text{g mL}^{-1}$), kao i oksidovani derivat terpena, komponenta terpinen-4-ol (1189 - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Kao najefikasnije pokazale su se komponente iz grupe oksidovanih derivata terpena – timol (22 - $76 \mu\text{g mL}^{-1}$) i karvakrol (7 - $28 \mu\text{g mL}^{-1}$), ali i eugenol ($90,5$ - $304 \mu\text{g mL}^{-1}$) iz grupe fenilpropanoidnih komponenti. Bakteriostatska aktivnost ove tri bioaktivne komponente postignuta je pri koncentracijama nižim od $350 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 5.22. Osetljivost odabranih *A. baumannii* izolata na biološki aktivne komponente etarskih ulja

Bioaktivne komponente	MIC vrednosti za <i>A. baumannii</i> sojeve*			
	ATCC 19606	Aba-4156	Aba-4914	Aba-5055
α -pinen	2000,00	2828,43	2828,43	3363,59
(R)-(+)-limonen	4756,83	6727,17	4756,83	5656,85
sabinen	1290,16	855,9876	1017,95	855,99
3-karen	2378,41	1681,79	4000,00	3363,59
α -teprinen	>32000,00	$\geq 32000,00$	>32000,00	>32000,00
γ -terpinen	>32000,00	>32000,00	>32000,00	>32000,00
terpinolen	>32000,00	>32000,00	>32000,00	>32000,00
(-)-terpinen-4-ol	1189,21	2000,00	2000,00	2000,00
timol	45,25	22,63	76,12	45,25
karvakrol	27,86	6,96	18,38	6,96
eugenol	304,43	128,00	90,51	181,02

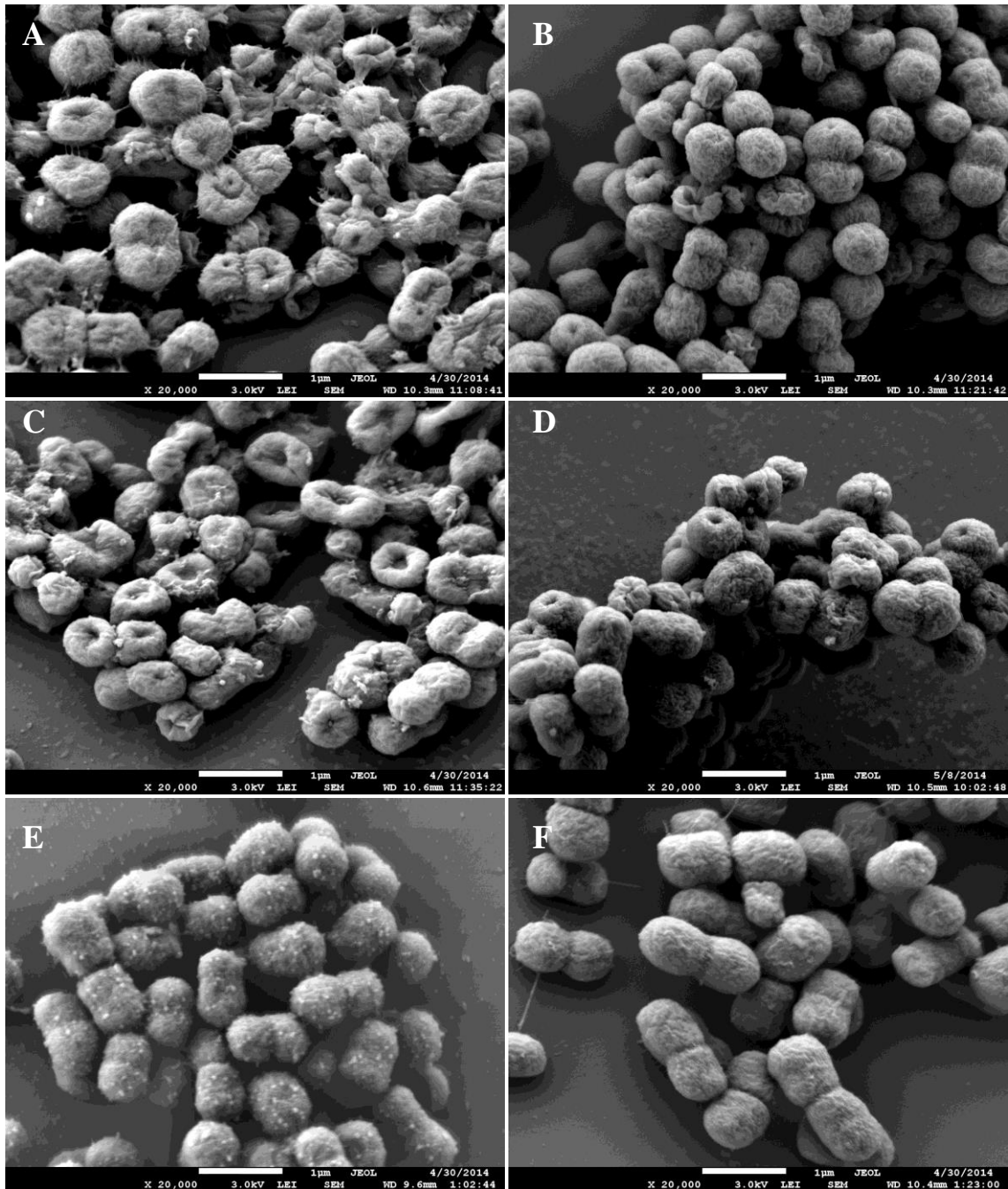
* MIC, minimalna inhibitorna koncentracija, vrednosti su izražene u jedinicama $\mu\text{g mL}^{-1}$ i predstavljaju geometrijsku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje tri nezavisna ponavljanja

5.3.5. MEHANIZAM DELOVANJA ETARSKIH ULJA

Rezultati skenirajuće elektronske mikroskopije ukazuju da membrane *A. baumannii* ćelija predstavljaju primarno mesto delovanja etarskih ulja, dok rezultati ispitivanja efekta etarskih ulja na gubitak makromolekula iz ćelija predstavljaju potvrdu primarnog delovanja testiranih etarskih ulja na bakterijske membrane.

5.3.5.1. SKENING ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA *A. baumannii* ĆELIJA

Radi utvrđivanja antibakterijskog efekta etarskih ulja na membranske strukture ćelije, tačnije spoljašnju membranu, vršena je skening elektronska mikroskopija tretiranih *A. baumannii* ćelija. Posmatrane su i fotografisane bakterijske ćelije tretirane etarskim uljima, koja su se pokazala kao veoma efikasna (etarska ulja *E. camaldulensis*, *M. communis*, *S. hortensis* i *T. serphyllum*), dok su kao kontrola korišćene ćelije tretirane samo rastvaračem DMSO-om u koncentraciji koja je korišćena u testovima i bakterijske ćelije bez tretmana. Na elektronomikrografijama se jasno može uočiti da su etarska ulja pri MIC koncentracijama narušila integritet površine ćelije, tj. spoljašnjeg omotača bakterijskih ćelija genovrste *A. baumannii* (slika 5.13). Efekat etarskih ulja vrsta *M. communis* i *S. hortensis* na spoljašnju membranu i integritet ćelije je na elektonomikrografijama uočljiviji (slika 5.13 A i C) u odnosu na efekat etarskih ulja *E. camaldulensis* i *T. serphyllum* (slika 5.13 B i D), koja su uzrokovala slična oštećenja, ali u manjoj meri. Na elektonomikrografijama se jasno mogu uočiti i mesta na kojima je došlo do oslobađanja (curenja, eng. *leakage*) ćelijskog sadržaja usled delovanja etarskih ulja. Takođe, jasno se može uočiti da DMSO, koji je korišćen u cilju poboljšanja rastvorljivosti etarskih ulja u svim testovima, nema efekta na bakterijske ćelije, s obzirom da je površina ćelija ostala celovita kao i kod potpuno netretiranih ćelija (slika 5.13 E i F).

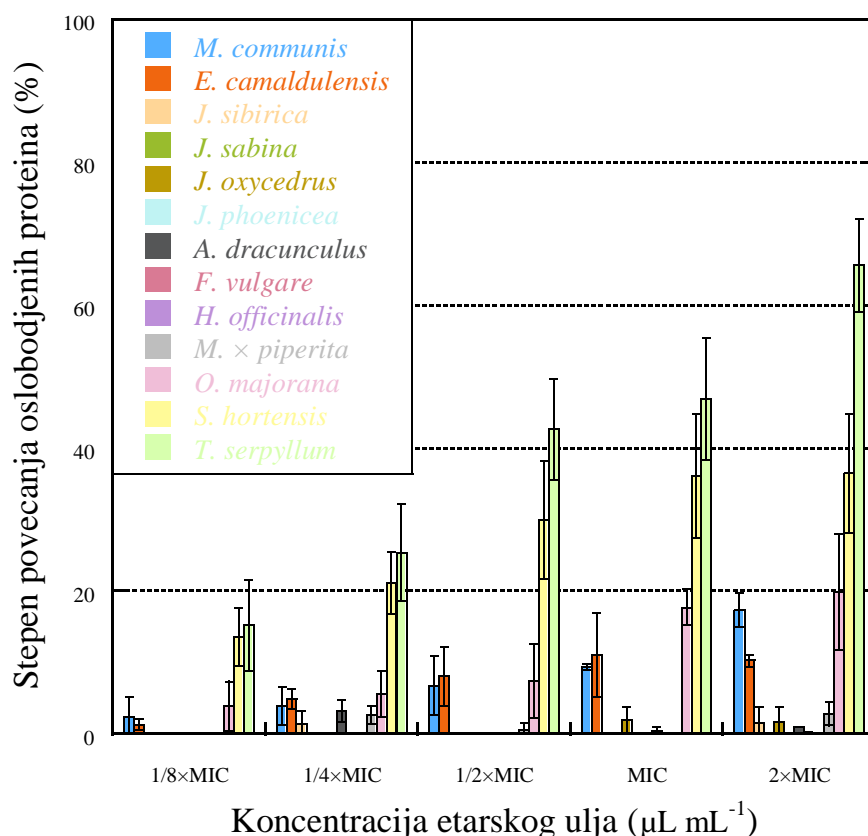


Slika 5.13. Efekat etarskih ulja na bakterijske ćelije genovrste *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606; bar linija 1 µm / uvećanje 20,000×

(A - etarsko ulje *M. communis*, B - etarsko ulje *E. camaldulensis*, C - etarsko ulje *S. hortensis*, D - etarsko ulje *T. serpyllum*, E – efekat DMSO-a, F - netretirane ćelije *A. baumannii*)

5.3.5.2. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA OSLOBAĐANJE PROTEINA IZ ČELIJA

Na grafikonu 5.14 je prikazan efekat etarskih ulja trinaest različitih biljnih vrsta na oslobođene proteine iz bakterijskih ćelija. Kao što se može uočiti etarska ulja četiri vrste roda *Juniperus*, kao i vrsta *A. dracunculus*, *F. vulgare* i *H. officinalis* nisu značajno uticala na povećanje količine proteina nakon tretmana različitim koncentracijama etarskih ulja ($1/8 \times \text{MIC}$, $1/4 \times \text{MIC}$, $1/2 \times \text{MIC}$, MIC i $2 \times \text{MIC}$). Slično ovim uljima etarsko ulje vrste *M. x piperita* je pri koncentracijama MIC i $2 \times \text{MIC}$ neznatno uticalo na uvećanje količine oslobođenih proteina za 3-5 %, odnosno proteini su oslobođeni u količini $22,19-22,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. Etarska ulja biljnih vrsta iz porodice Myrtaceae, *M. communis* i *E. camaldulensis*, uticale su na povećanje oslobođene količine proteina za 7-10 %, odnosno detektovano je $23,6-24,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih proteina pri koncentracijama $1/2 \times \text{MIC}$ i MIC , dok je pri koncentraciji $2 \times \text{MIC}$ uvećanje iznosilo 10-18 %, odnosno $24,62-25,91 \mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih proteina. Značajnija uvećanja oslobođenih proteina, pri koncentracijama MIC i $2 \times \text{MIC}$, izazvala su etarska ulja vrsta *O. majorana* (uvećanje je 19-22 %, odnosno $22,97-26,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih proteina), *S. hortensis* (37-38 %, odnosno $25,22-30,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih proteina) i *T. serpyllum* (48-65 %, što iznosi $25,56-36,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih proteina).



Grafikon 5.14. Efekta etarskih ulja na oslobađanje proteina iz ćelija *A. baumannii* referentnog soja ATCC 19606

Bitno je istaći da se etarsko ulje *T. serpyllum* ispoljilo najbolji efekat na oslobađanje proteina iz ćelija, jer je pri koncentraciji $1/2 \times \text{MIC}$ uzrokovalo veće oslobađanje proteina nego ostala etarska ulja pri maksimalnim ispitivanim koncentracijama ($2 \times \text{MIC}$) (grafikon 5.14).

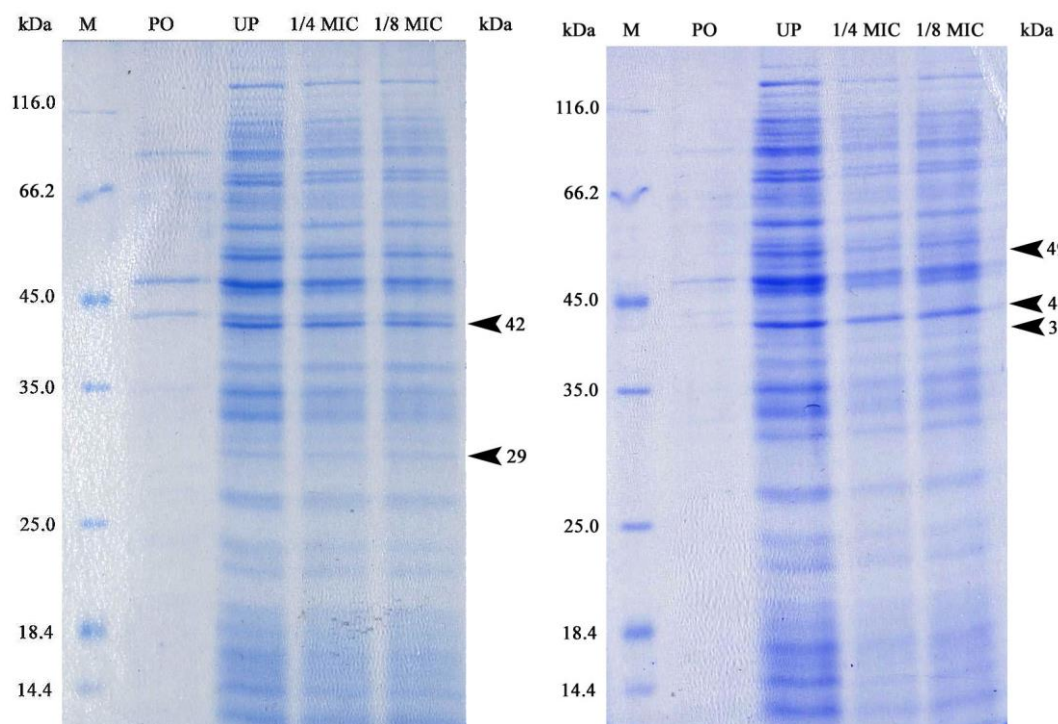
Statističkom analizom dobijenih rezultata stepena oslobađanja proteina iz ćelija pod uticajem etarskih ulja utvrđena je statistički značajna linearna korelacija između stepena oslobođenih proteina i koncentracije etarskog ulja *M. communis* ($\tau = 1$, $P=0,014$), *E. camaldulensis* ($\tau = 0,8$, $P=0,05$), *O. majorana* ($\tau = 1$, $P=0,014$), *S. hortensis* ($\tau = 1$, $P=0,014$) i *T. serpyllum* ($\tau = 1$, $P=0,014$).

5.3.5.3. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA PROTEINSKI PROFIL *A. baumannii*

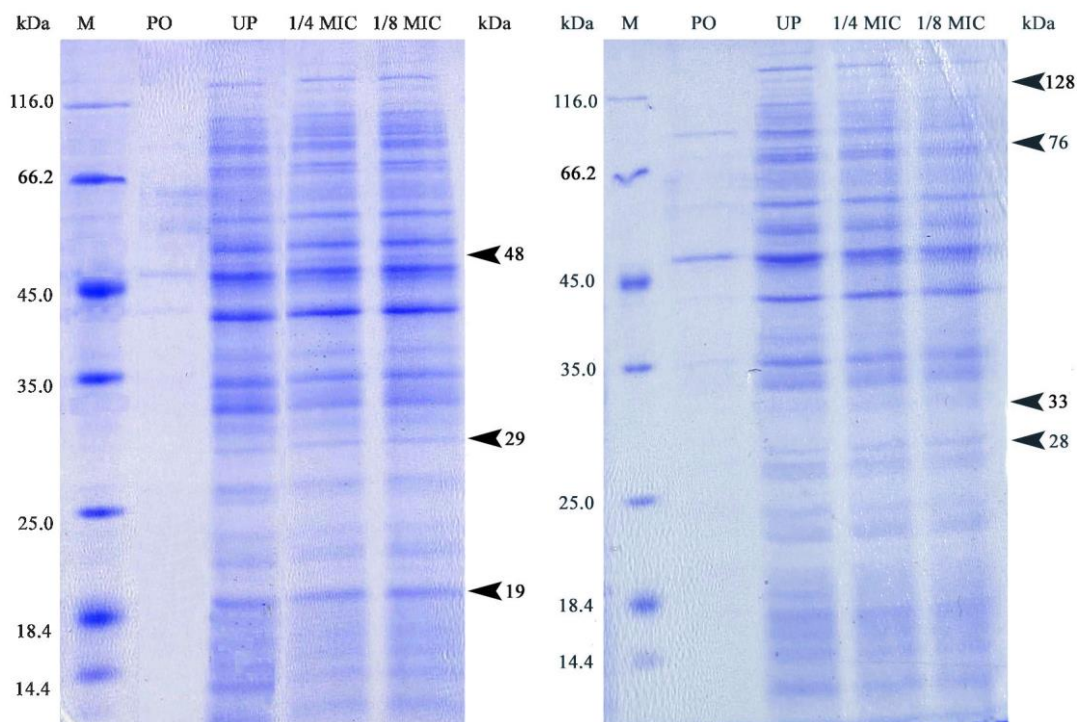
Efekti etarskih ulja mirte i eukaliptusa na proteinski profil četiri odabrana *A. baumannii* soja (Aba-4914, Aba-4803, Aba-4156 i Aba-8833) nakon SPS-PAGE elektroforeze ukazali su da tretman različitim koncentracijama etarskih ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* ne utiče na kvalitativne promene ekspresije detektabilnih proteina metodom SDS-PAGE. Na slici 5.14 predstavljeni su proteini omotača i ukupni proteini sojeva Aba-4914 i Aba-4803, kao i ukupni proteini nakon tretmana različitim koncentracijama etarskog ulja *M. communis*. Kod oba soja najuočljivija su dva proteina omotača *A. baumannii* molekulske mase oko 48 i 43 kDa. Oba soja imaju veoma sličan proteinski profil, ali mogu se uočiti razlike u ekspresiji nekoliko proteina. Soj Aba-4914, okarakterisan kao rezistentniji na antibiotike, uključujući i imipenem, ekspimirao je proteine veličine oko 29 kDa i 42 kDa, koji nisu vidljivi u proteinskom profilu osetljivijeg soja Aba-4803. Međutim, osetljiviji Aba-4803 soj je ekspimirao tri proteina veličine oko 39, 41 i 49 kDa, koje multiplo rezistentni soj Aba-4914 ne poseduje u svom proteinskom profilu (slika 5.14). I pored ovih razlika, jasno se može uočiti da etarsko ulje vrste *M. communis* u subinhibitornim koncentracijama nije uticalo na promenu ekspresije gena detektovanih proteina i generalno na proteinski profil ni jednog od dva ispitivana *A. baumannii* izolata, ali uočljivo je smanjenje količine proteina kod oba soja nakon tretmana različitim koncentracijama ($1/4 \times \text{MIC}$ i $1/8 \times \text{MIC}$) etarskog ulja u poređenju sa ukupnim proteinima *A. baumannii* izolata kada nisu tretirani etarskim uljem.

Proteinski profili *A. baumannii* sojeva Aba-4156 i Aba-8833 bez tretmana i nakon tretmana etarskim uljem vrste *E. camaldulensis* prikazani su na slici 5.15. Jasno se može uočiti da su proteinski profili oba odabrana izolata kao i u prethodnom slučaju veoma slični. Kod otpornijeg soja Aba-4156, na gelu su vidljivi proteini veličina oko 19, 29 i 49 kDa, dok kod soja Aba-8833 nije došlo do ekspresije ovih proteina, već proteina veličine oko 28, 76 i 128 kDa, koje multiplo rezistentni soj Aba-4156 nije ekspimirao. Takođe, kod soja Aba-8833 uočljivo je blago pojačanje intenziteta trake veličine 33 kDa nakon tretmana subinhibitornim koncentracijama ($1/4 \times \text{MIC}$ i $1/8 \times \text{MIC}$) etarskog ulja eukaliptusa u odnosu na intenzitet iste trake u ukupnim proteinima ovog soja bez tretmana. Proteinski profil oba

soja ukazuje na postojanje izvesnog stepena inhibicije proteina, odnosno smanjene ekspresije, koja se manifestuje opadanjem vidljivosti proteinskih traka na gelu nakon tretmana etarskim uljem *E. camaldulensis* u koncentracijama 1/4×MIC i 1/8×MIC.



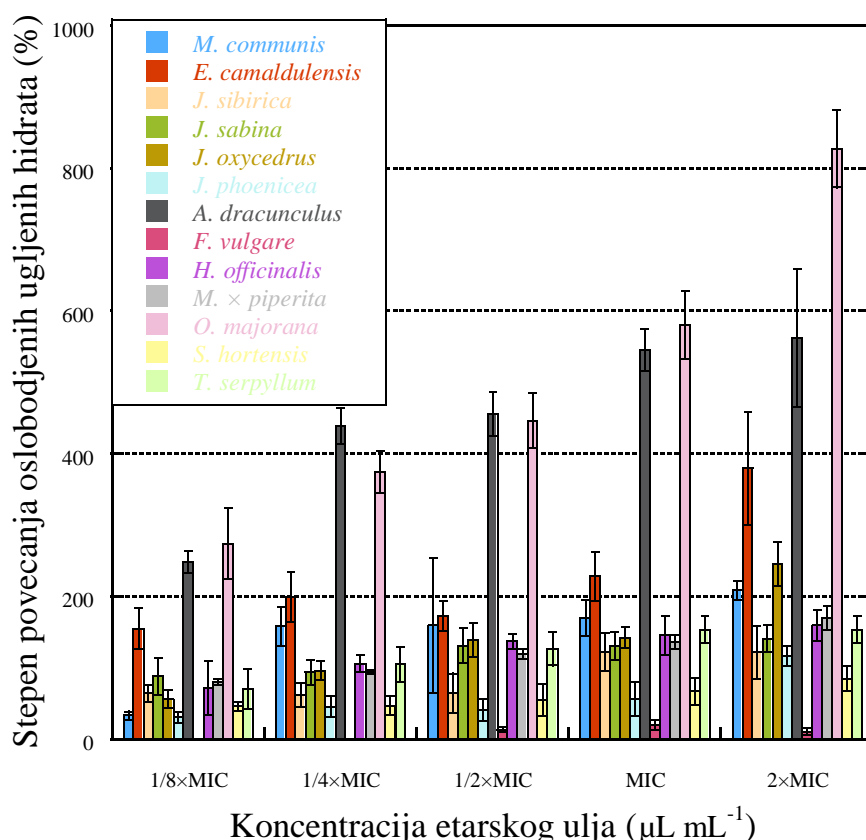
Slika 5.14. Proteini *A. baumannii* sojeva Aba-4914 (levo) i Aba-4803 (desno) (M-marker, PO-proteini omotača, UP-ukupni proteini, 1/4×MIC i 1/8×MIC – ukupni proteini nakon tretmana ćelija etarskim uljem *M. communis*)



Slika 5.15. Proteini *A. baumannii* sojeva Aba-4156 (levo) i Aba-8833 (desno) (M-marker, PO-proteini omotača, UP-ukupni proteini, 1/4×MIC i 1/8×MIC – ukupni proteini nakon tretmana ćelija etarskim uljem *E. camaldulensis*)

5.3.5.4. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA OSLOBAĐANJE UGLJENIH HIDRATA IZ ĆELIJA

Efekat etarskih ulja na oslobađanje ugljenih hidrata iz ćelija je detektovan kod većine etarskih ulja (grafikon 5.15), osim kod etarskog ulja *F. vulgare* koje je ispoljilo najslabiji efekat. Efekat etarskih ulja ostalih vrsta bio je nešto veći, jer je detektovana količina oslobođenih ugljenih hidrata iz ćelija bila čak do dva puta uvećana u odnosu na kontrolu. Kod etarskih ulja biljaka roda *Juniperus* detektovano je 8,78-21,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih ugljenih hidrata, etarsko ulje *Hyssopus officinalis* je uticalo na oslobađanje ugljenih hidrata u količini 16,37-22,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok je etarsko ulje *Mentha x piperita* izazvalo oslobađanje ugljenih hidrata u količini 15,80-18,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Primena *Satureja hortensis* etarskog ulja je uzrokovala oslobađanje 10,08-13,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ugljenih hidrata, a etarsko ulje vrste *Thymus serpyllum* 17,38-23,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih ugljenih hidrata. Značajniji efekat na oslobađanje ugljenih hidrata, pri koncentraciji $2\times\text{MIC}$, ispoljila su etarska ulja *M. communis* (1,2 puta, odnosno 21,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *J. oxycedrus* (1,5 puta, odnosno 21,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i *E. camaldulensis* (3,8 puta, odnosno 26,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih ugljenih hidrata).



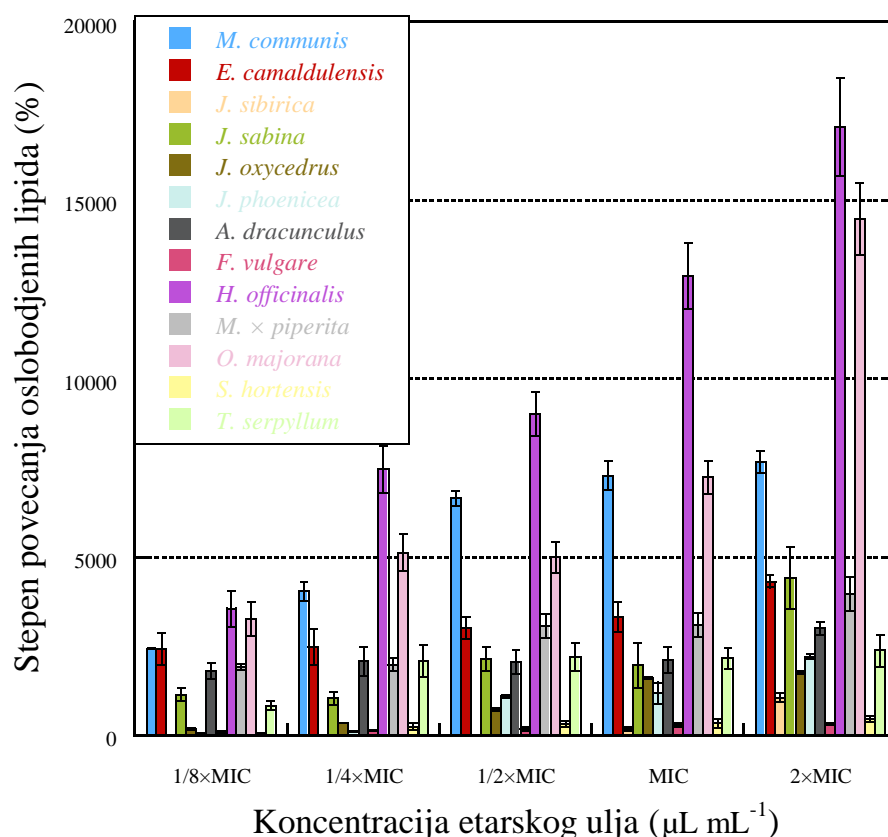
Grafikon 5.15. Efekat etarskih ulja na oslobađanje ugljenih hidrata iz ćelija *A. baumannii* referentnog soja ATCC 19606

Kao najefektivnija ulja su se pokazala etarska ulja vrsta *Artemisia dracunculus* i *Oreganum majorana* koja su pri koncentraciji $1/8\times\text{MIC}$ ispoljila veći efekat nego ostala etarska ulja pri

koncentracijama $2\times\text{MIC}$. Etarska ulja ove dve vrste su pri koncentraciji $2\times\text{MIC}$ uticala na bakterijske ćelije tako da je količina oslobođenih ugljenih hidrata delovanjem etarskog ulja vrste *Artemisia dracunculus* iznosila $36,30 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno uvećana je za 5,75 puta, dok je delovanjem etarskog ulja vrste *Oreganum majorana* količina oslobođenih ugljenih hidrata uvećana za 8,3 puta u odnosu na količinu ugljenih hidrata netretiranih ćelija, što je iznosilo $49,22 \mu\text{g mL}^{-1}$. Statističkom obradom dobijenih rezultata utvrđena je značajna linearna korelacija između stepena oslobađanja ugljenih hidrata iz ćelije i primenjenih koncentracija etarskih ulja biljaka *M. communis*, *T. serpyllum*, *S. hortensis*, *O. majorana*, *M. x piperita*, *H. officinalis*, *A. dracunculus* i *J. oxycedrus* ($\tau = 1$, $P=0,014$), kao i biljaka *E. camaldulensis*, *J. sabina* i *J. phoenicea* ($\tau = 0,8$, $P=0,05$), dok kod etarskih ulja biljaka *J. sibirica* ($\tau = 0,6$, $P=0,14$) i *F. vulgare* ($\tau = 0,53$, $P=0,20$) usled ostvarenog slabog efekta na oslobođene ugljene hidrate nije detektovana statistički značajna linearna korelacija.

5.3.5.5. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA OSLOBAĐANJE LIPIDA IZ ĆELIJA

Etarska ulja su ispoljila veiki uticaj na oslobađanje lipida iz ćelija (grafikon 5.16). Najslabiji efekat ispoljilo je etarsko ulje *J. sibirica*, koje je pri MIC vrednosti uzrokovalo oslobađanje $31 \mu\text{g mL}^{-1}$ lipida, a pri $2\times\text{MIC}$ oslobađanje $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ lipida.



Grafikon 5.16. Efekat etarskih ulja na oslobađanje lipida iz ćelija *A. baumannii* referentnog soja ATCC 19606

Nešto bolji efekat ispoljila su etarska ulja vrsta *F. vulgare* i *S. hoetensis*, a uvećanje količine oslobođenih lipida pri najvećoj koncentraciji ulja iznosilo je 3,1 puta, što iznosi $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih lipida, odnosno $4,7\times$ ($63 \mu\text{g mL}^{-1}$ oslobođenih lipida), redom. Kao efikasnija etarska ulja pokazala su se ulja vrsta *M. x piperita* (oslobođeno $222\text{-}448 \mu\text{g mL}^{-1}$ lipida), *E. camladulensis* ($278\text{-}486 \mu\text{g mL}^{-1}$), *M. communis* ($279\text{-}856 \mu\text{g mL}^{-1}$) i *O. majorana* ($371\text{-}1604 \mu\text{g mL}^{-1}$). Najbolji efekat je imalo etarsko ulje *H. officinalis* koje je je pri različitim koncentracijama uzrokovalo oslobađanje lipida u koncentraciji od 402 do $1889 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Statističkom obradom dobijenih rezultata utvrđena je statistički značajna linearna korelacija između stepena povećanja oslobađanja lipida i primenjenih koncentracija etarskih ulja biljaka *M. communis*, *E. camaldulensis*, *J. oxycedrus*, *J. phoenicea*, *F. vulgare*, *H. officinalis*, *M. x piperita*, *S. hortensis* ($\tau = 1$, $P=0,014$), *J. sibirica* ($\tau =0,84$, $P=0,04$), kao i etarska ulja biljaka *T. serpyllum*, *O. majorana* i *A. dracunculus* ($\tau =0,8$, $P=0,05$), osim za etarsko ulje biljke *J. sabina* ($\tau =0,6$, $P=0,14$).

5.4. EFEKAT KOMBINACIJE ANTIMIKROBNIH AGENASA NA

A. baumannii

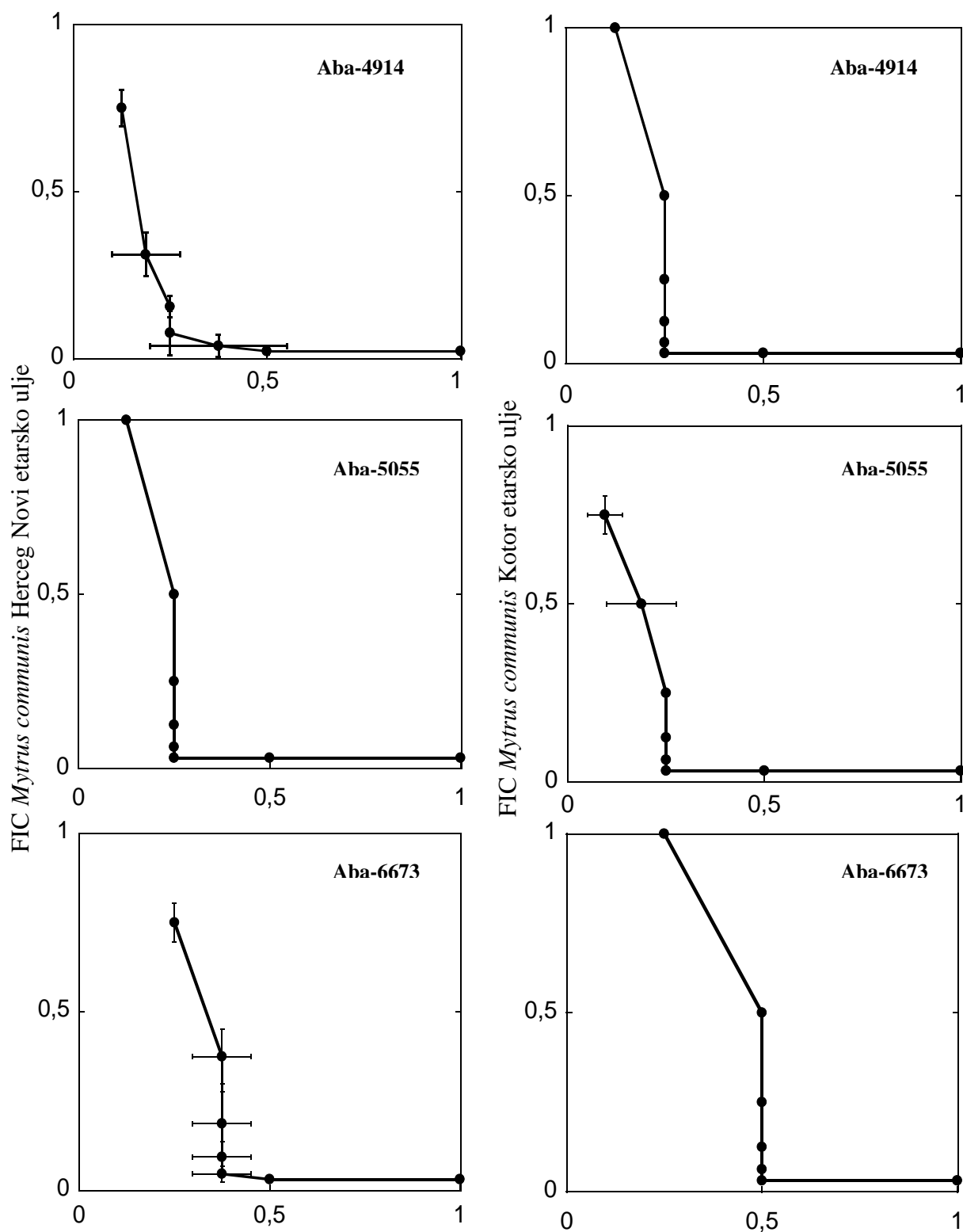
Antimikrobna aktivnost nekonvencionalnih agenasa ispitana je i u kombinaciji sa konvencionalnim antimikrobnim agensima u *in vitro* uslovima protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata.

5.4.1. EFEKAT KOMBINACIJE RAZLIČITIH TIPOVA ANTIMIKROBNIH AGENASA

Sinergistički efekat odabranih konvencionalnih antibiotika i etarskih ulja prema izračunatim FIC vrednostima je predstavljen na grafikonima 5.17-5.22. Za tri odabrana multiplo rezistentna *A. baumannii* izolata iz rana, sinergistička aktivnost je detektovana za većinu kombinacija etarskih ulja i antibiotika.

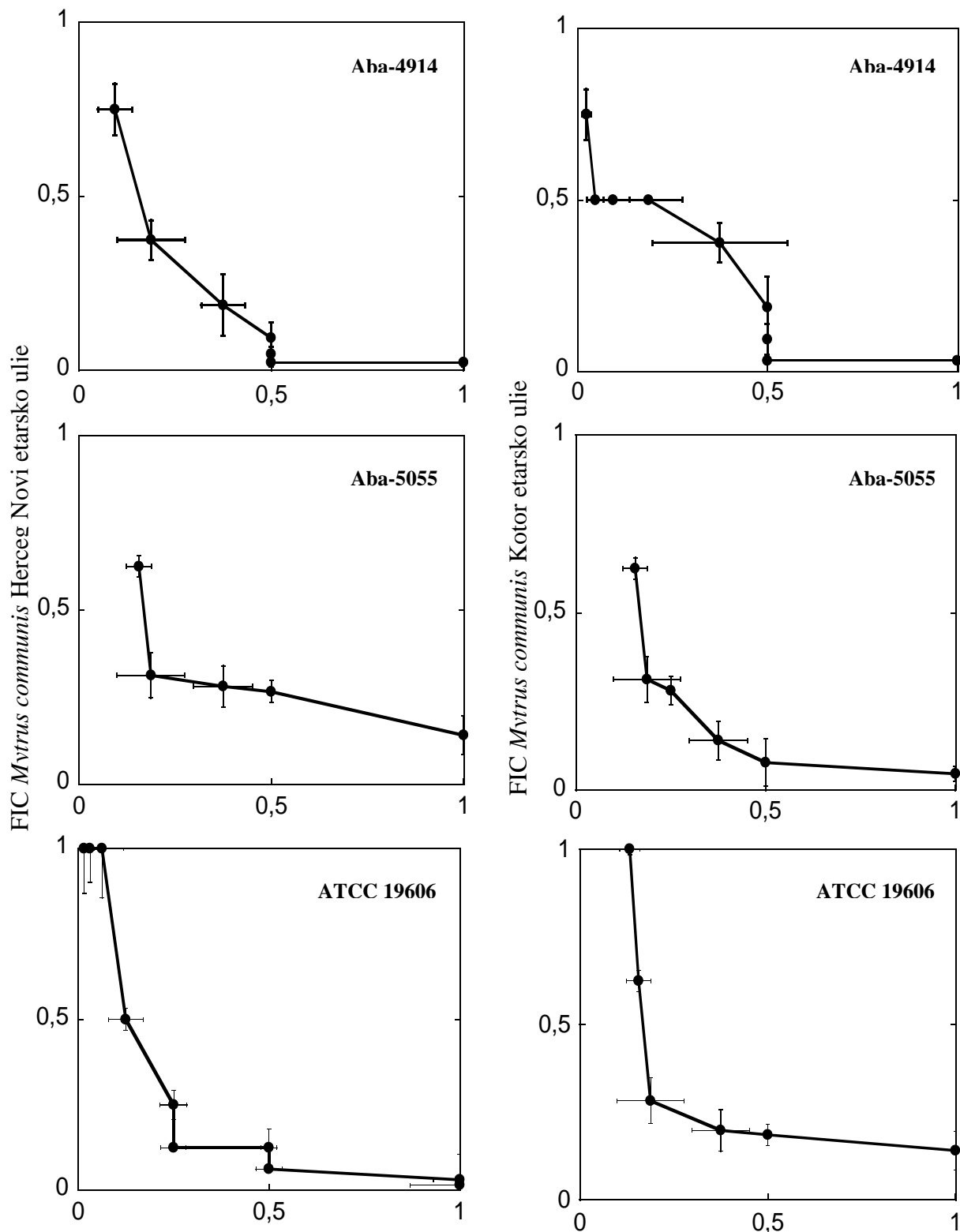
Kombinacija subinhibitornih koncentracija etarskih ulja *M. communis* (MyHN i MyK) sa antibioticima ciprofloksacin i polimiksin B se pokazala kao efikasna. Kada je testirana interakcija etarskih ulja mirte u koncentracijama od 0,125 do 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ($1/32\times\text{MIC}$ do $1/4\times\text{MIC}$) sa ciprofloksacinom u koncentraciji 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($1/4\times\text{MIC}$), sinergizam je detektovan protiv sva tri izolata (Aba-4914, Aba-5055 i Aba-6673) FICI=0,25-0,5 (grafikon 5.17). Takođe, iste koncentracije ulja u kombinacijama sa polimiksinom B u koncentraciji 1-2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($1/4\times\text{MIC}$ do $1/2\times\text{MIC}$) su rezultovale graničnim sinergizom protiv sojeva Aba-4914 i Aba-5055 (FICI=0,5) (grafikon 5.18). Kombinacija protiv izolata Aba-6673 nije testirana zato što je izolat bio osetljiv na polimiksin B. Testirane kombinacije gentamicina (16-64 $\mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $1/32\times\text{MIC}$ do $1/8\times\text{MIC}$) sa etarskim uljima mirte (0,5-1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, odnosno $1/8\times\text{MIC}$ do $1/4\times\text{MIC}$) protiv soja Aba-4914 rezultovale su sinergističkim interakcijama (FICI=0,25-0,31), dok je kombinacija ovih agenasa protiv Aba-6673 rezultirala graničnim aditivnim do indiferentnim efektom (FICI=0,75-1,5) (grafikon 5.19).

FIC Ciprofloksacin

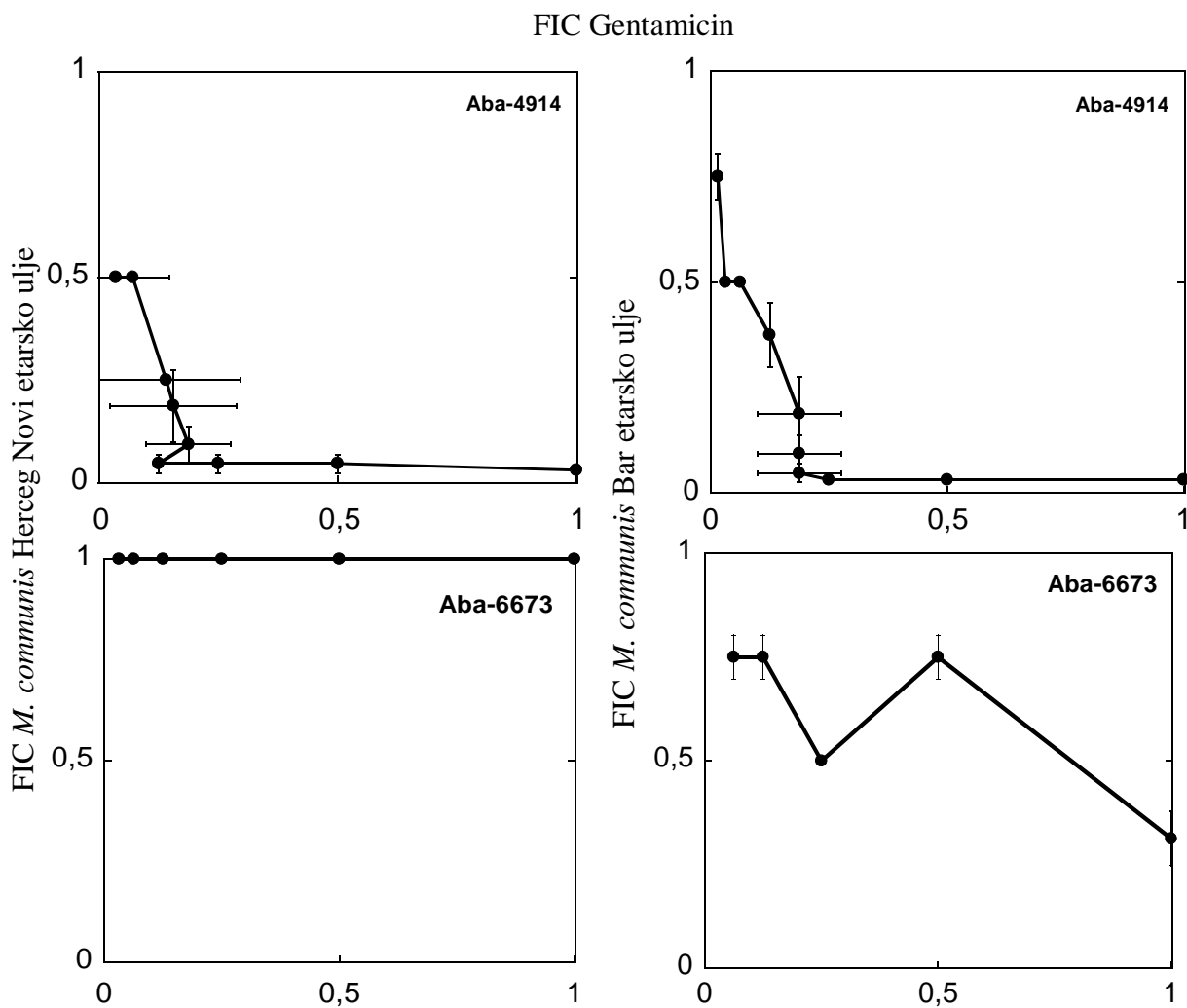


Grafikon 5.17. Sinergistički efekat ciprofloksacina i etarskih ulja *M. communis* protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata

FIC Polimiksin B



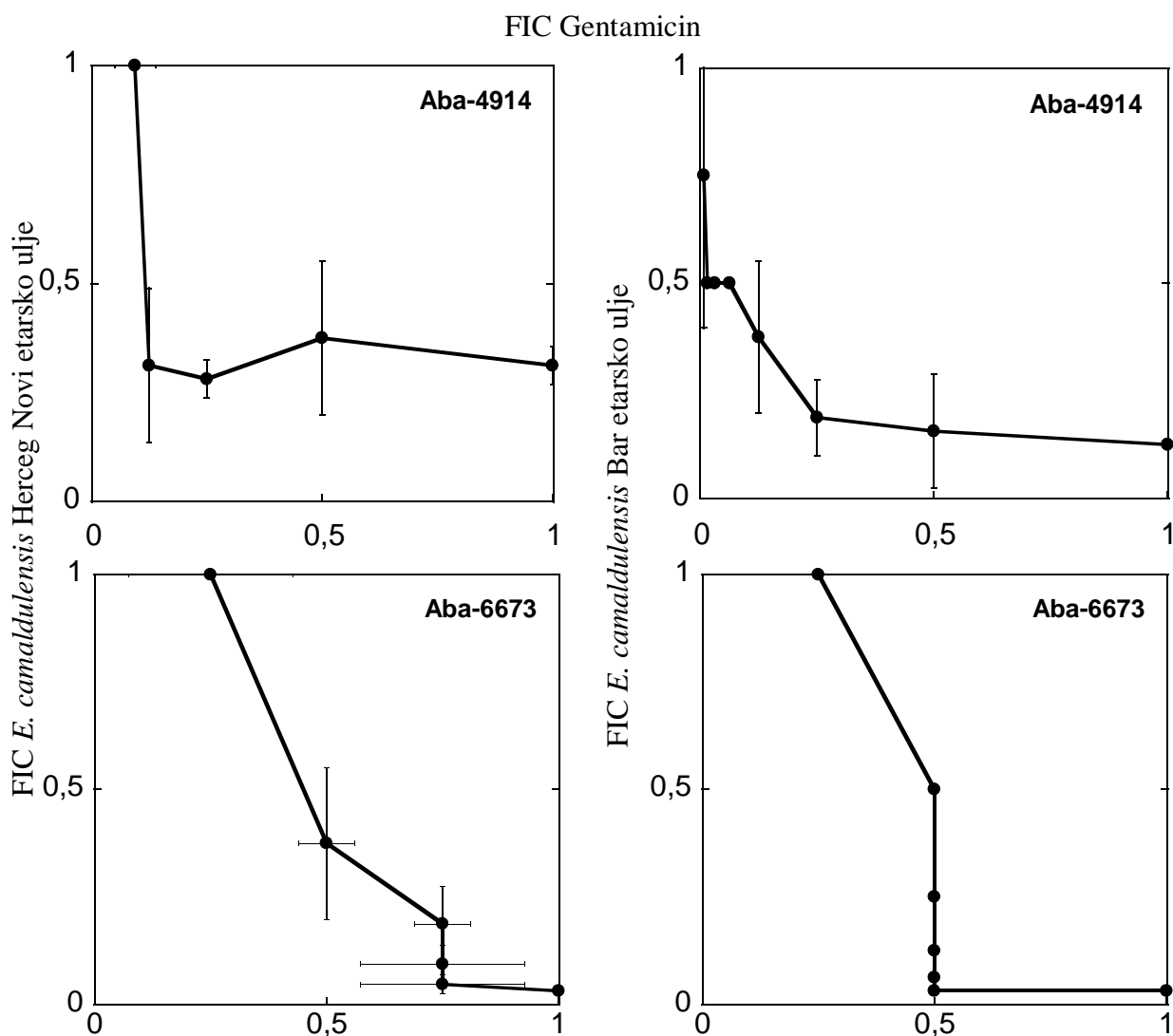
Grafikon 5.18. Sinergistički efekat polimiksina B i etarskih ulja *M. communis* protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata



Grafikon 5.19. Sinergistički efekat gentamicina i etarskih ulja *M. communis* protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata

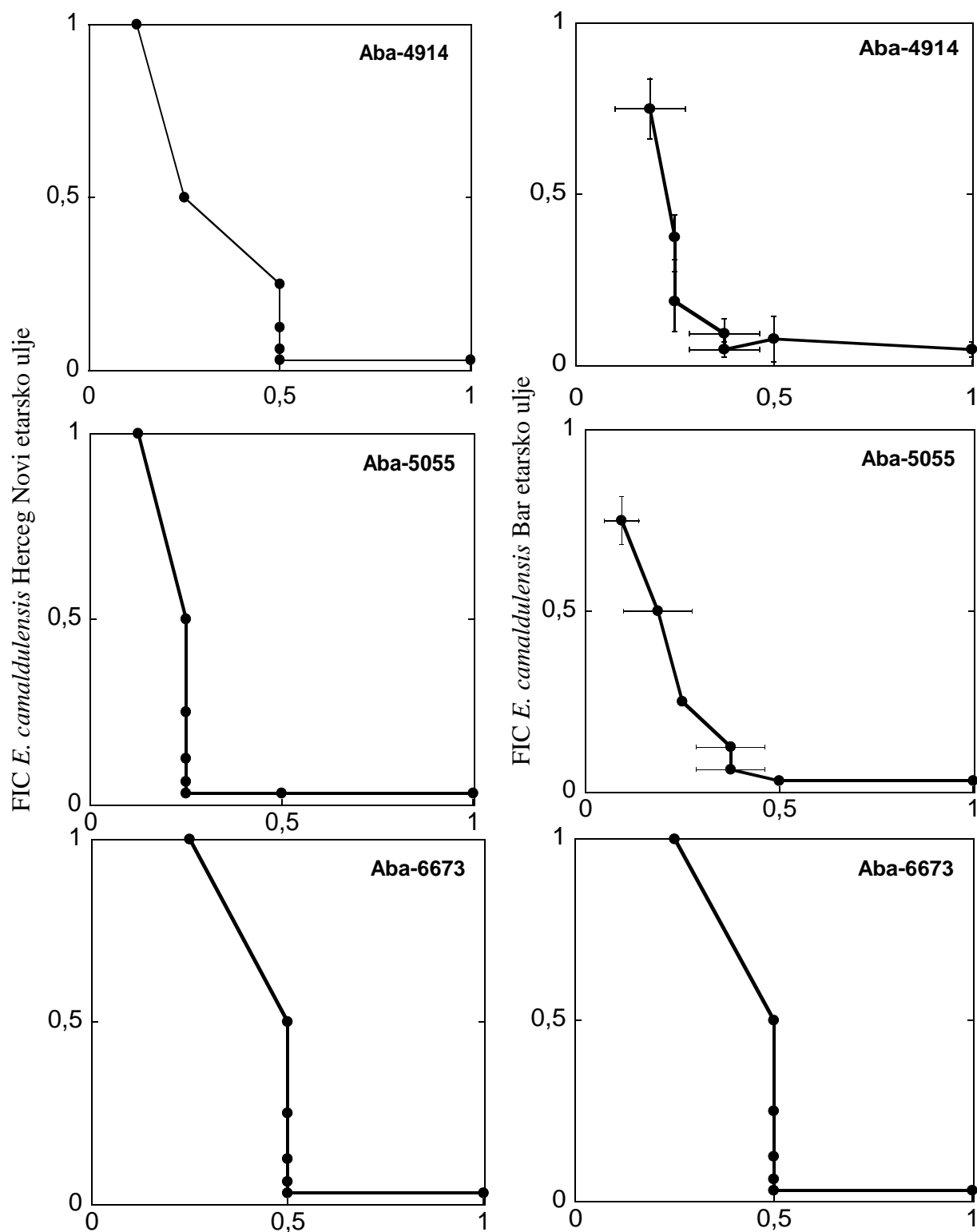
Efekat kombinacija etarskih ulja *E. camaldulensis* (EuHN i EuB) i konvencionalnih antibiotika je prikazan na grafikonima 5.20-5.22. Rezultati kombinacije gentamicina ($64-128 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1/4 \times \text{MIC}$ do $1/8 \times \text{MIC}$) sa etarskim uljima eukaliptusa ($0,25-0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$, $1/4 \times \text{MIC}$ do $1/8 \times \text{MIC}$) su bili slični onim dobijenim za etarska ulja mirte, tj. utvrđen je sinergizam kod soja Aba-4914 ($\text{FICI}=0,25-0,5$), dok je protiv izolata Aba-6673 utvrđen aditivan do indiferentan efekat ($\text{FICI}=0,75-1$) (grafikon 5.20). Kada su etarska ulja eukaliptusa (u koncentraciji $0,25-0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$, odnosno $1/4 \times \text{MIC}$ do $1/2 \times \text{MIC}$) kombinovana sa ciprofloksacinom ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $1/4 \times \text{MIC}$) detektovan je sinergizam protiv sva tri testirana izolata ($\text{FICI}=0,31-0,5$), ali je najbolji sinergistički efekat ostvaren na soju Aba-5055, dok je na soju Aba-6673 ostvaren granični sinergizam (grafikon 5.21). Kombinacija etarskih ulja eukaliptusa ($0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$, $1/4 \times \text{MIC}$) sa polimiksinom B ($0,25-0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$,

1/8×MIC do 1/4×MIC) se takođe pokazala kao efikasna, jer je sinergistički efekat detektovan u kombinacijama protiv sojeva ATCC19606, Aba-4914 i Aba-5055 (sinergizam sa uljem EuHN, ali aditivan efekat sa uljem EuB) (grafikon 5.22). Iako je referentni soj ATCC 19606 bio osetljiv na konvencionalne antibiotike, ispitan je i utvrđen sinergizam etarskih ulja (MyHN, MyK, EuHN i EuB) pri koncentracijama 0,5-0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (1/8×MIC-1/4×MIC) u kombinaciji sa polimiksinom B (0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1/4×MIC) zbog ponovljivosti rezultata od strane drugih autora, jer je soj iz ATCC kolekcije kultura.



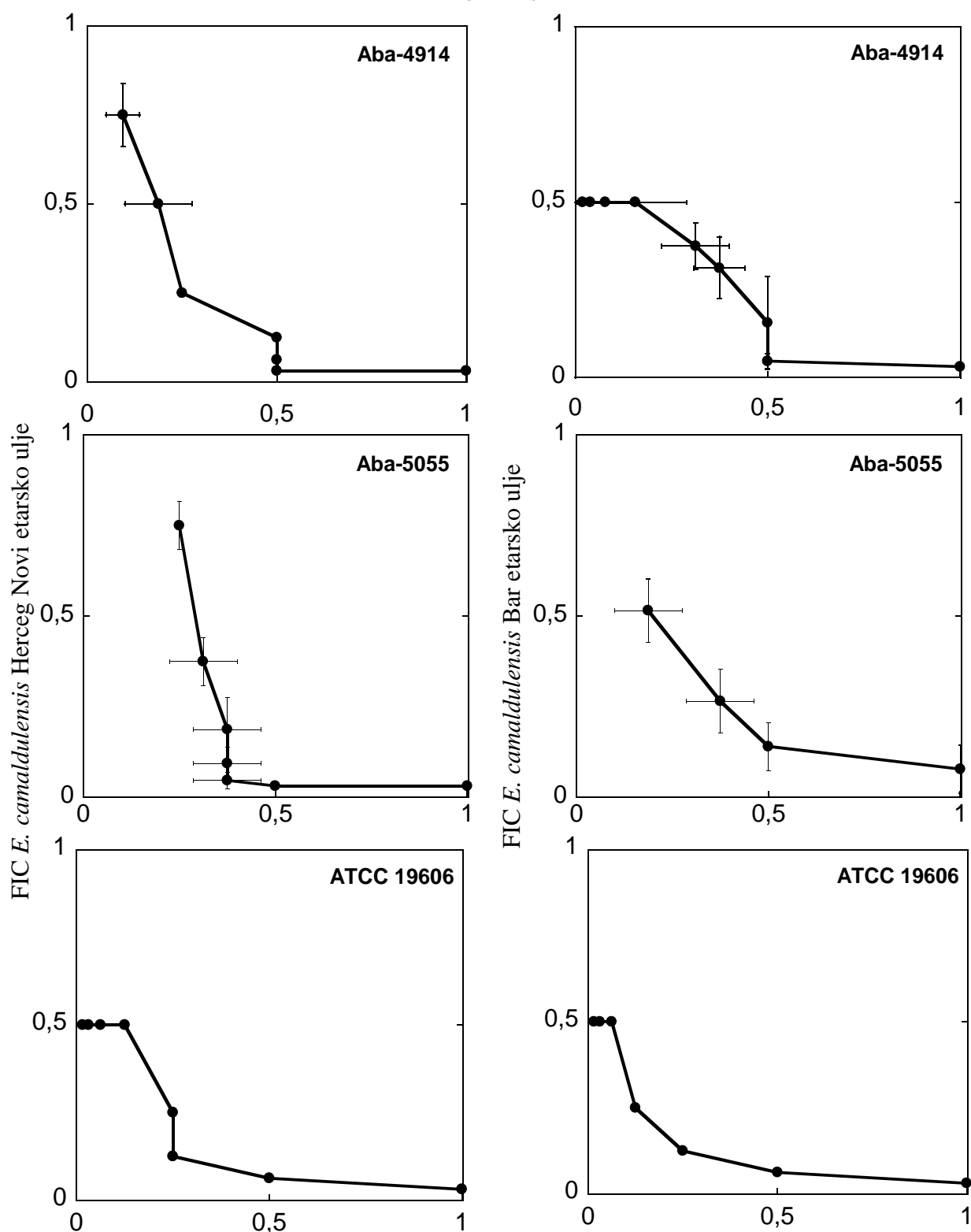
Grafikon 5.20. Sinergistički efekat gentamicina i etarskih ulja *E. camaldulensis* protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata

FIC Ciprofloksacin



Grafikon 5.21. Sinergistički efekat ciprofloksacina i etarskih ulja *E. camaldulensis* protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata

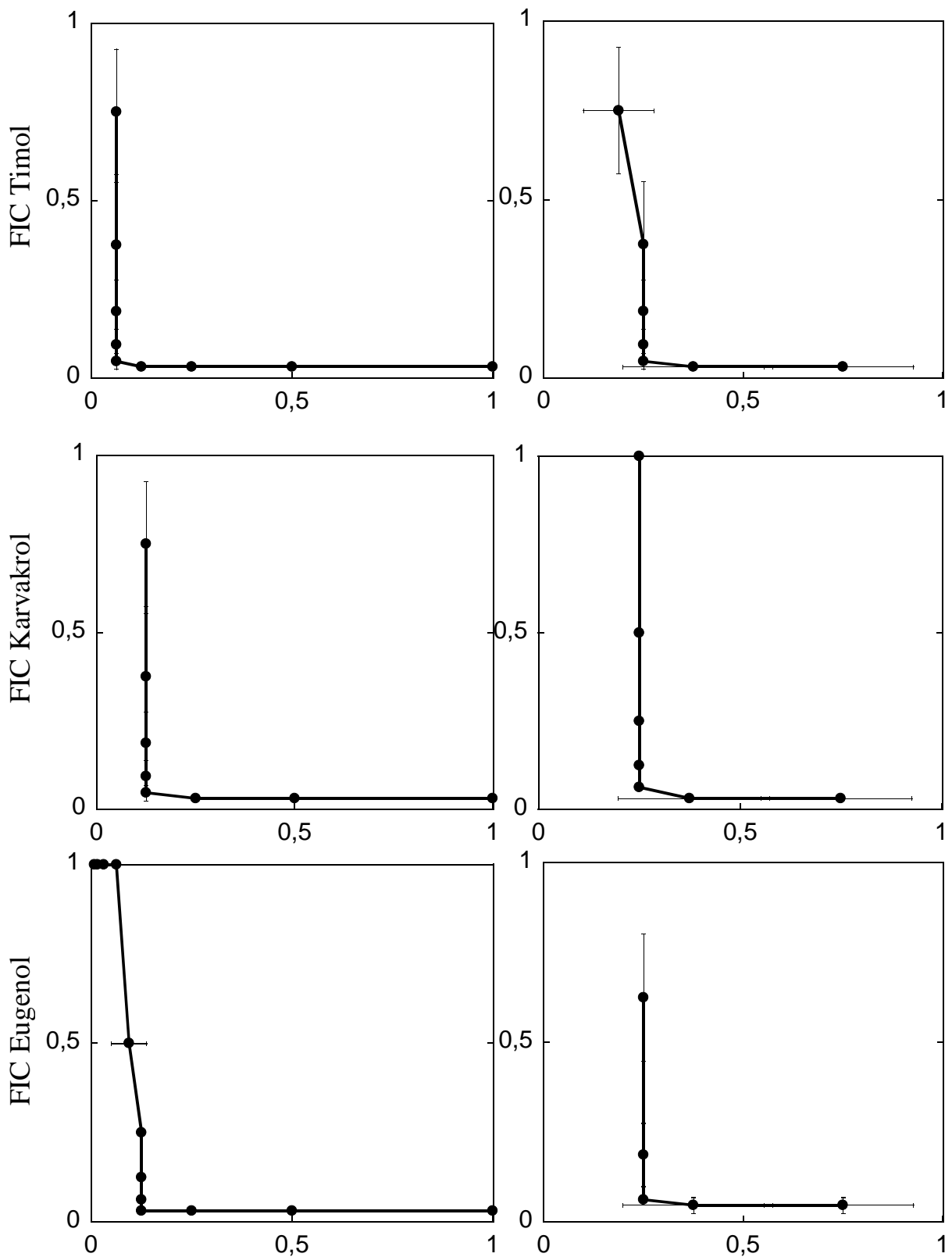
Polimiksin B



Grafikon 5.22. Sinergistički efekat polimiksina B i etarskih ulja *E. camaldulensis* protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata

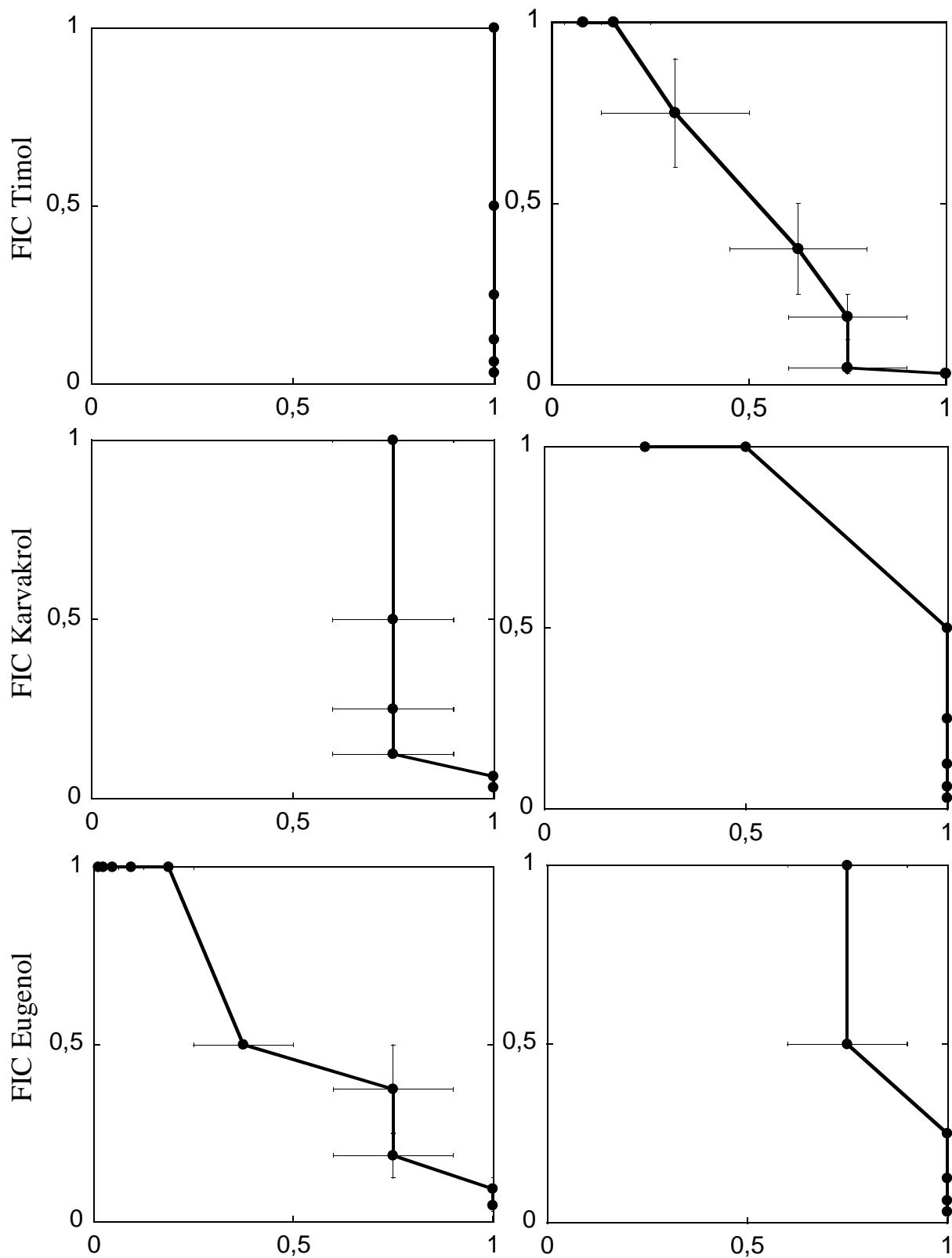
Kombinovani efekat odabranih konvencionalnih antibiotika i biološki aktivnih komponenti etarskih ulja prema izračunatim FIC vrednostima je predstavljen na grafikonima 5.23-5.25. Za referentni soj ATCC 19606 detektovana je sinergistička aktivnost kada su bioaktivne komponente timol (MIC 45,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), karvakrol (MIC 27,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i eugenol (MIC 304,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$) u koncentracijama od $1/4 \times \text{MIC}$ do $1/32 \times \text{MIC}$ kombinovane sa ciprofloksacinom u koncentraciji 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($1/4 \times \text{MIC}$) (grafikon 5.23). Vrednosti FICI za kombinacije bioaktivnih komponenti sa ciprofloksacinom bile su niže od graničnih vrednosti za sinergizam (FICI=0,125-0,375). Sinergistički efekat je utvrđen i za kombinacije gentamicina (u koncentraciji 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $1/4 \times \text{MIC}$) sa komponentama karvakrol i eugenol u koncentracijama od $1/4 \times \text{MIC}$ i $1/8 \times \text{MIC}$ (grafikon 5.25), a FICI vrednost sinergističkih kombinacija karvakrola i eugenola sa gentamicinom je bila bliska graničnoj vrednosti za sinergizam (FICI=0,375-0,5). Aditivan efekat je detektovan kada je gentamicin kombinovan sa timolom, pri čemu je vrednost FICI iznosila 0,53-0,75. Za razliku od konvencionalnih antibiotika ciprofloksacina i gentamicina, kombinacije polimiksina B (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $1/2 \times \text{MIC}$) sa bilo kojom od bioaktivnih komponenti rezultirale su indiferentnim efektom (FICI=1,0-1,5) (grafikon 5.24). Kada je protiv multiplo rezistentnog izolata Aba-4914 testirana kombinacija ovog antibiotika u koncentraciji 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($1/2 \times \text{MIC}$) sa komponentama etarskih ulja timol (MIC 76,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$), karvakrol (MIC 18,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i eugenol (MIC 90,51 $\mu\text{g mL}^{-1}$) u koncentracijama $1/2 \times \text{MIC}$ i $1 \times \text{MIC}$, takođe je utvrđen indiferentan efekat (FICI=1,0-1,5). Indiferentan efekat (FICI=1,125-1,5) je detektovan i u kombinaciji gentamicina (u koncentracijama $\leq 128 \mu\text{g mL}^{-1}$) sa karvakrolom i timolom, dok kombinacija gentamicin-eugenol nije uticala na inhibiciju rasta multiplo rezistentnog izolata Aba-4914. Protiv multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata, kao i protiv referentnog soja, kombinacije ciprofloksacina sa bioaktivnim komponentama timol (FICI=0,28-0,5), karvakrol (FICI=0,31-0,5) i eugenol (FICI=0,31-0,5) ostvarile su sinergistički efekat (grafikon 5.23). U sinergističkim kombinacijama smanjene su MIC vrednosti bioaktivnih komponenti etarskih ulja ($1/4 \times \text{MIC}$ do $1/16 \times \text{MIC}$), ali i ciprofloksacina i gentamicina na 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

FIC Ciprofloksacin



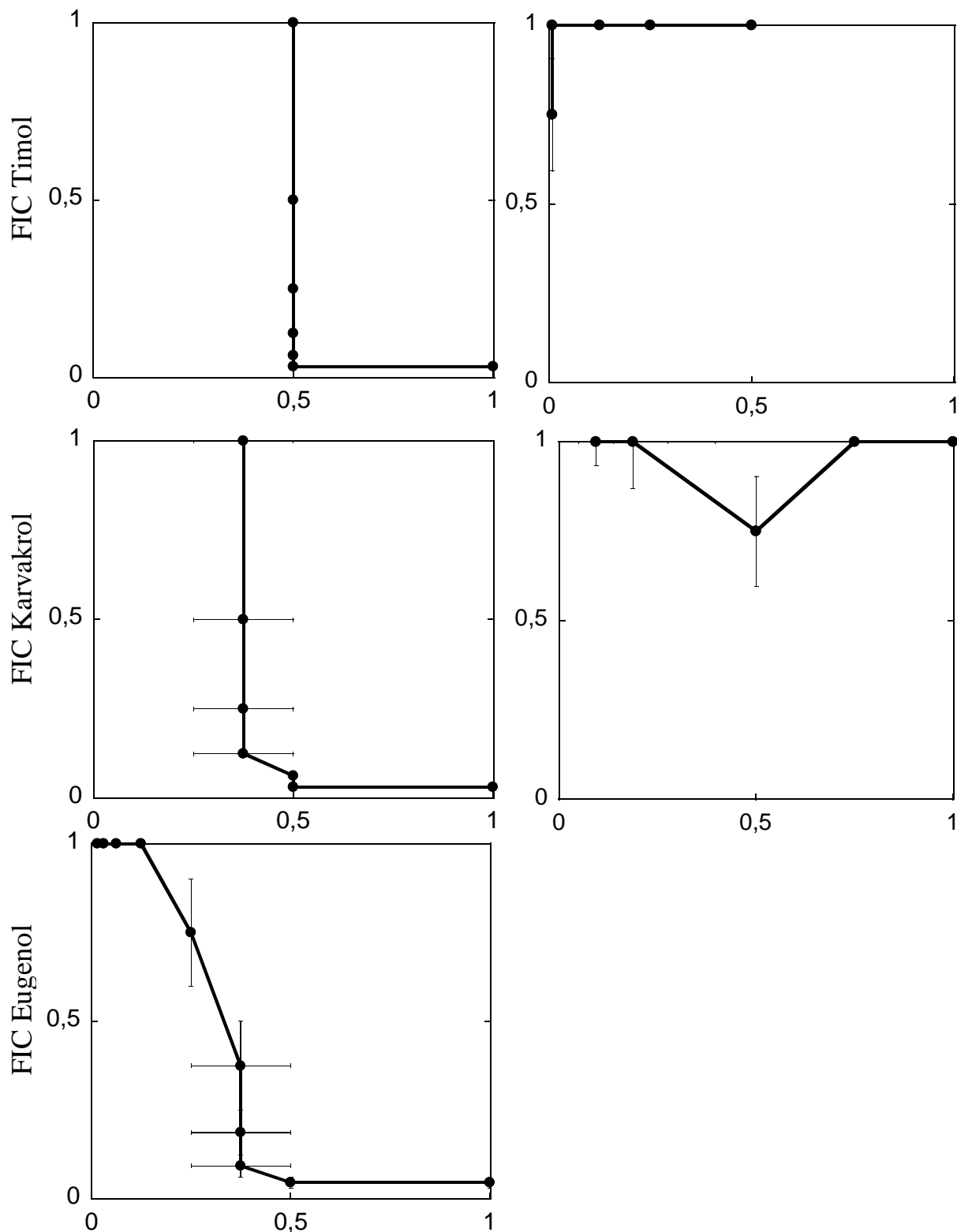
Grafikon 5.23. Sinergistički efekat ciprofloksacina i biološki aktivnih komponenti etarskih ulja protiv *A. baumannii* sojeva ATCC19606 (levo) i Aba-4914 (desno)

FIC Polimiksin B



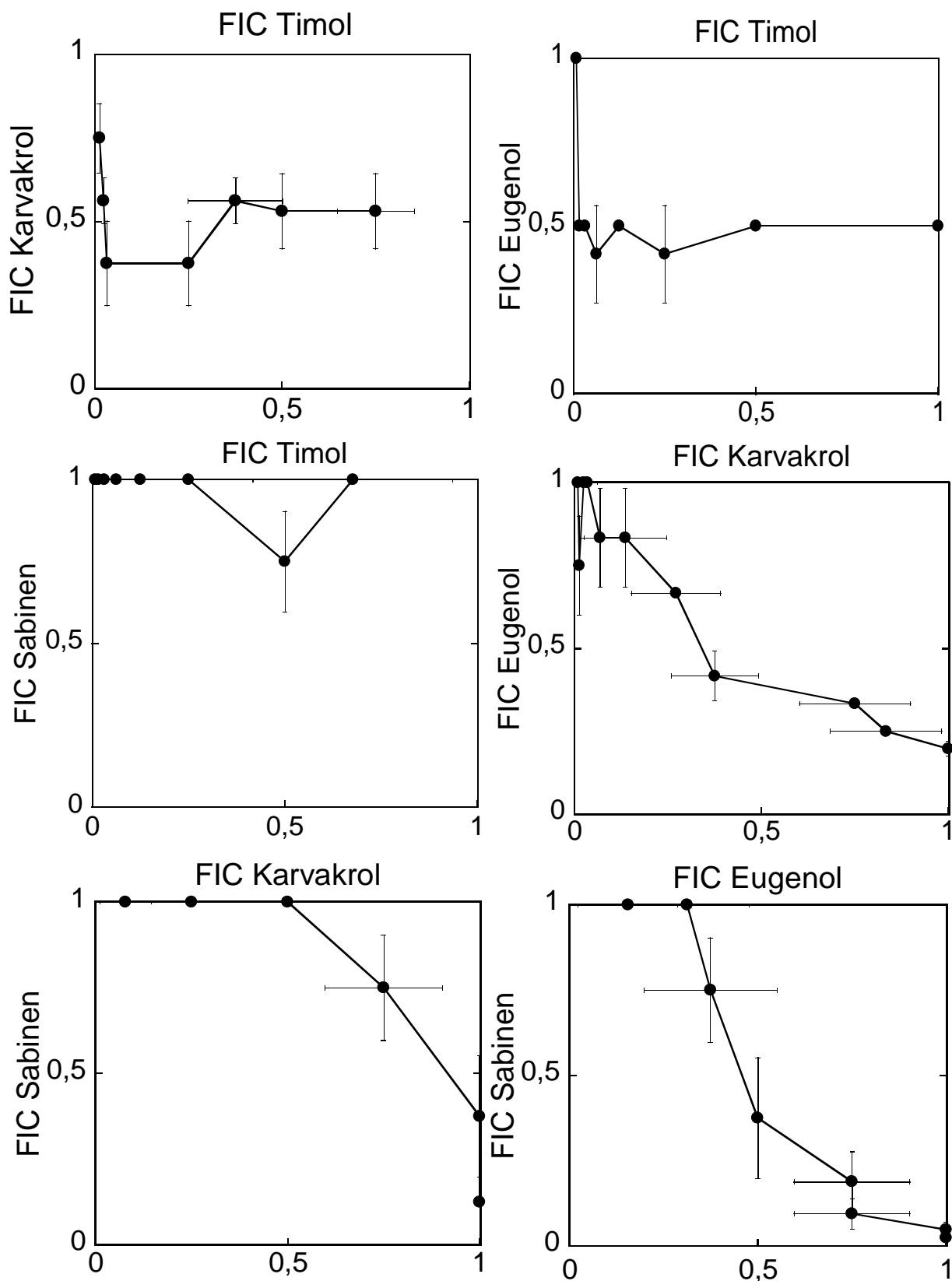
Grafikon 5.24. Sinergistički efekat polimiksina B i biološki aktivnih komponenti etarskih ulja protiv *A. baumannii* sojeva ATCC19606 (levo) i Aba-4914 (desno)

FIC Gentamicin

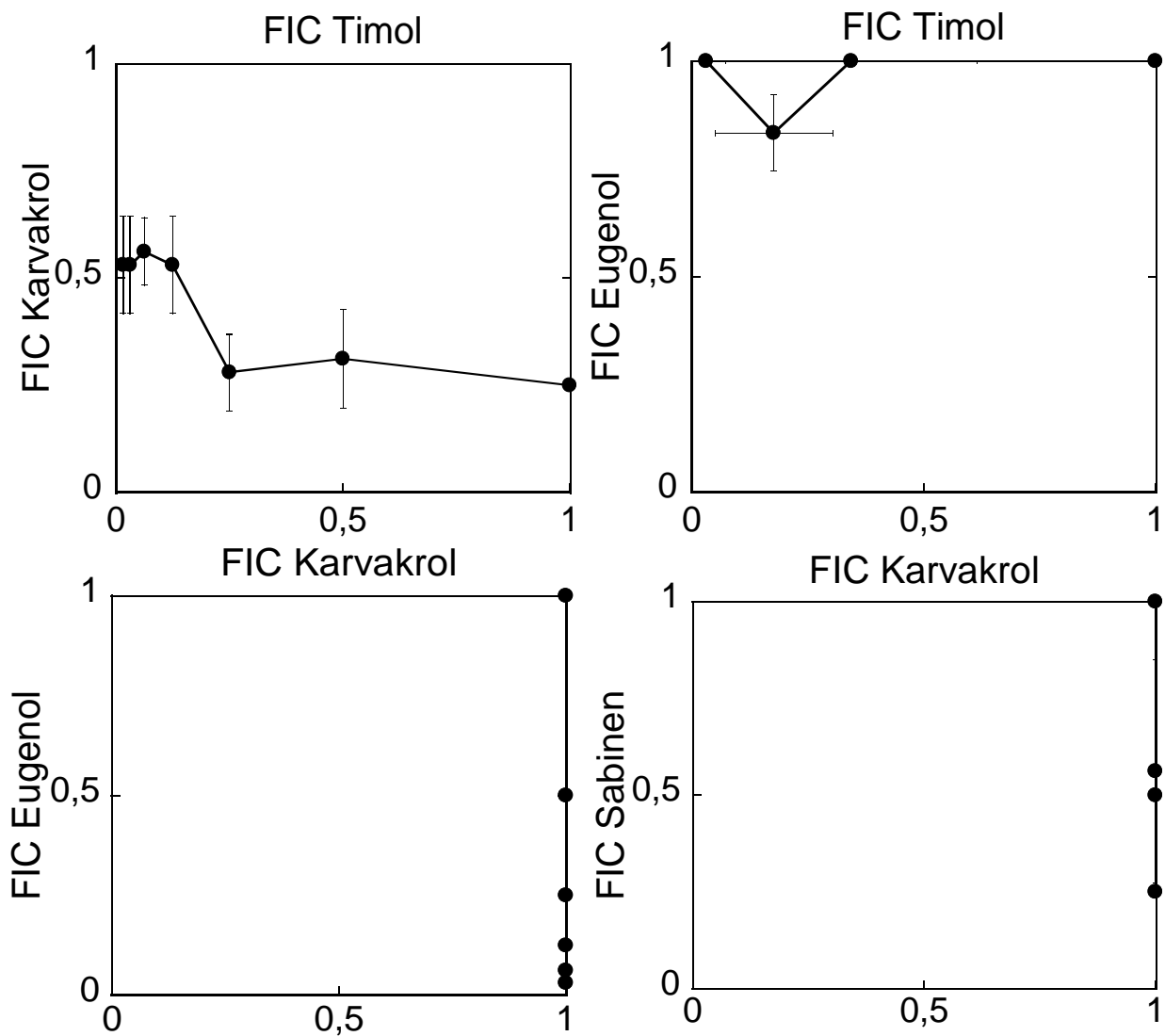


Grafikon 5.25. Sinergistički efekat gentamicina i biološki aktivnih komponenti etarskih ulja protiv *A. baumannii* sojeva ATCC19606 (levo) i Aba-4914 (desno)

Sinergistički efekat odabranih biološki aktivnih komponenti prema izračunatim FIC vrednostima je predstavljen na grafikonima 5.26 i 5.27. Za *A. baumannii* soj ATCC 19606 sinergistička aktivnost je detektovana u dve kombinacije bioaktivnih komponenti etarskih ulja i to kombinaciji eugenol-timol (FICI=0,5) i karvakrol-timol (FICI=0,5). U sinergističkoj kombinaciji karvakrol-timol koncentracije obe komponente su bile smanjene na vrednost od $1/4 \times \text{MIC}$. Kombinacija eugenola i timola je dala sinergistički efekat protiv soja *A. baumannii* ATCC 19606 i takođe smanjila MIC vrednost bioaktivnih komponenti, tako da je sinergistička kombinacija protiv ATCC 19606 soja bila $1/16 \times \text{MIC}$ za timol i $1/4 \times \text{MIC}$ za eugenol. Kombinacija istih komponenti u koncentracijama $1/32 \times \text{MIC}$ za timol i $1/8 \times \text{MIC}$ za eugenol je rezultovala parcijanim sinergizmom ili aditivnim efektom (FICI=0,51-0,75) protiv multiplo rezistentnog izolata Aba-4914. Kombinacija subinhibitornih koncentracija karvakrola i eugenola pokazala se kao relativno dobra, jer je ostvaren aditivan efekat (FICI=0,625-0,75), dok su kombinacije ostalih bioaktivnih komponenti protiv referentnog soja ATCC 19606 ostvarile aditivan efekat (FICI=0,75-1,5) (grafikon 5.26). Kada su testirane interakcije bioaktivnih komponenti protiv izolata Aba-4914, kombinacija timola i karvakrola je za rezultat imala aditivan efekat (FICI=0,75), kombinacije karvakrol-eugenol i karvakrol-sabinen imale su granični aditivan do indiferentan efekat (grafikon 5.27), dok kombinacije timol-sabinen i eugenol-sabinen nisu prikazane jer nisu ostvarile uticaj na inhibiciju rasta multiplo rezistentnog izolata.



Grafikon 5.26. Sinergistički efekat kombinacije biološki aktivnih komponenti etarskih ulja protiv *A. baumannii* soja ATCC 19606

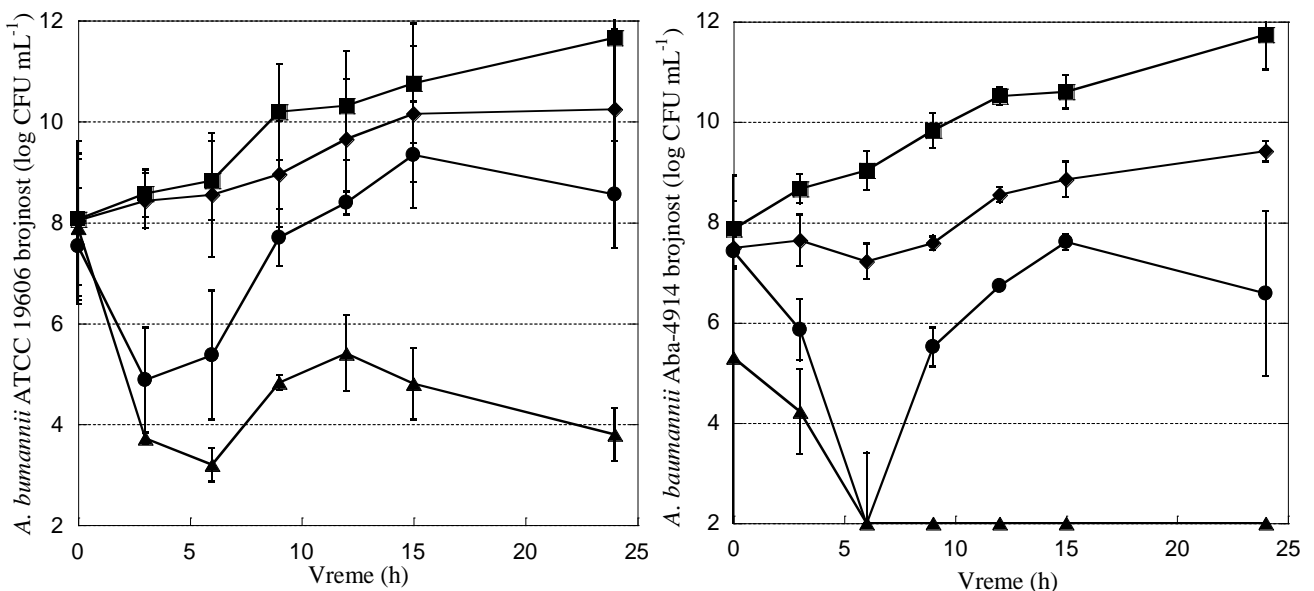


Grafikon 5.27. Sinergistički efekat kombinacije biološki aktivnih komponenti etarskih ulja protiv multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata Aba-4914

Antibakterijska aktivnost četiri biološki aktivne komponente biljnih ekstrakata (kvercetin, katehin, cimetna kiselina i emodin) nije detektovana, jer su MIC i MBC vrednosti bioaktivnih supstanci bile veće od maksimalnih ispitivanih. Takođe, nijedna od ispitivanih kombinacija bioaktivnih komponenta biljnih ekstrakata nije bila efikasna protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata (podaci nisu prikazani).

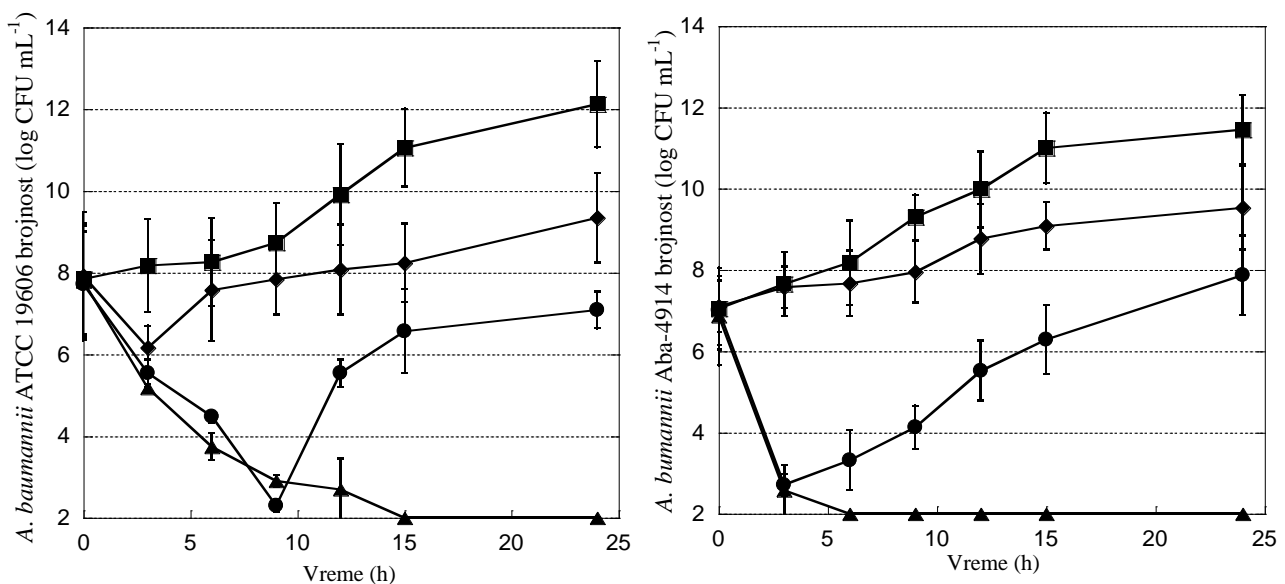
5.4.2. KINETIKA INHIBICIJE RASTA *A. baumannii* IZOLATA KOMBINACIJOM ETARSKIH ULJA I POLIMIKSINA B

Efekat kombinacije subinhibitornih koncentracija etarskog ulja *M. communis* (MyHN) i polimiksina B protiv referentnog soja ATCC 19606 je potvrđen određivanjem brojnosti vijabilnih ćelija odgajivačkom metodom u funkciji vremena i prikazan *time kill* krivom (grafikon 5.28). Redukcija brojnosti bakterija u prvih 6 h inkubacije je bila veća od 3 log u poređenju sa početnom brojnošću, ali u narednih 6 h brojnost je počela da raste sa približno 3 log na 5 log. Sinergizam agenasa u kombinaciji je postignut nakon 6 h inkubacije, a razlika u brojnosti ćelija tretiranih samo aktivnijim pojedinačnim agensom (polimiksin B) u odnosu na broj ćelija tretiranih agensima u kombinaciji je iznosila 2,17 log CFU mL⁻¹. Konačna brojnost bakterija nakon tretmana kombinacijom agenasa bila je manja od 4 log. Ovakvo smanjenje brojnosti je značajno i veće od efekta antimikrobnih agenasa kada su primenjeni pojedinačno (grafikon 5.28). Sinergistički efekat istih antimikrobnih agenasa protiv multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata Aba-4914 pokazao je značajnu redukciju brojnosti bakterijskih ćelija u poređenju sa početnom brojnošću i/ili kada su antimikrobni agensi primenjeni pojedinačno. Sinergizam je postignut nakon 9 h inkubacije, gde je razlika u brojnosti vijabilnih ćelija između tretmana polimiksinom B i tretmana kombinacijom agenasa iznosila 5,51 log CFU mL⁻¹. Kombinacija subinhibitornih koncentracija etarskog ulja MyHN i polimiksina B redukovala je brojnost multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rane ispod granice detekcije (grafikon 5.28).



Grafikon 5.28. Kinetika inhibicije rasta *A. baumannii* referentnog soja ATCC 19606 (levo) i multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata Aba-4914 (desno) primenom kombinacije subinhibitornih koncentracija etarskog ulja *M. communis* i polimiksina B (■) bakterija bez tretmana, (●) antibiotik, (◆) etarsko ulje, (▲) etarsko ulje i antibiotik)

Testiranjem kinetike inhibicije bakterijskih ćelija genovrste *A. baumannii* kombinacijom subinhibitornih koncentracija EuHN i polimiksina B dobijeni su takođe značajni rezultati (grafikon 5.29). Kada je ova kombinacija testirana protiv referentnog soja ATCC 19606, posle 6 h inkubacije brojnost je redukovana za više od 4 log, a nakon 12 h inkubacije brojnost je redukovana ispod granice detekcije. Sinergistička aktivnost ove kombinacije je postignuta nakon 12 h inkubacije, a razlika u brojnosti vijabilnih ćelija između tretmana polimiksinom B i njegove kombinacije sa etarskim uljem eukaliptusa iznosila je 2,84 log CFU mL⁻¹. Nakon 24 h redukcija brojnosti u kombinaciji je iznosila više od 7 log u poređenju sa redukcijom brojnosti efikasnijim antimikrobnim agensom (polimiksinom B). Ista kombinacija antimikrobnih agenasa se pokazala kao još efikasnija kada je testirana protiv multiplo rezistentnog izolata Aba-4914 (grafikon 5.29). Naime, do trećeg sata inkubacije efekat kombinacije antimikrobnih agenasa i efekat polimiksina B je bio isti, odnosno redukovao je brojnost bakterijskih ćelija za oko 4 log. Međutim, nakon 6 h inkubacije brojnost ćelija tretiranih samo polimiksinom B je počela da raste, dok je brojnost ćelija tretiranih kombinacijom antimikrobnih agenasa redukovana do granice detekcije. Sinergistička aktivnost ove kombinacije protiv multiplo rezistentnog soja je postignuta nakon 6 h inkubacije pri razlici u brojnosti vijabilnih ćelija većoj od 3,32 log CFU mL⁻¹, kada se uporedi tretman aktivnijim agensom sa tretmanom kombinacije agenasa. Konačan stepen redukcije brojnosti kombinacijom antimikrobnih agenasa je bio za više od 4 log veći u odnosu na brojnost primenom antimikrobnih agenasa pojedinačno.



Grafikon 5.29. Kinetika inhibicije rasta *A. baumannii* referentnog soja ATCC 19606 (levo) i multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata Aba-4914 (desno) primenom kombinacije subinhibitornih koncentracija etarskog ulja *E. camaldulensis* i polimiksina B (■) bakterija bez tretmana, (●) antibiotik, (◆) etarsko ulje, (▲) etarsko ulje i antibiotik)

6. DISKUSIJA

6.1. KOLEKCIJA *A. baumannii* IZOLATA

Genomske vrste kompleksa *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (familija Moraxellaceae) obuhvataju vrste 1, 2, 3 i 13 TU. Iako ih je fenotipski teško razlikovati, samo predstavnici *Acinetobacter baumannii*, tj. genomske vrste 2 rastu na temperaturi od 41 °C i 44 °C, uz izuzetak nekih predstavnika 13 TU genovrste, koji takođe mogu da rastu na ovim temperaturama (Brenner i sar., 2005).

Jedna od zanimljivih osobina genomske vrste *A. baumannii* je i sposobnost rasta na minimalnim podlogama sa različitim izvorom ugljenika. Utvrđeno je ranije da kao izvor ugljenika ova bakterija može da usvaja L-laktat, glutarat, L-aspartat, L-tirozin, etanol, 2,3-butandiol, i DL-aminobutirat. Većina sojeva ove vrste koriste i L-fenilalanin i fenilacetat, zatim L-histidin, azelat, D-malat, L-leucin, β -alanin, *trans*-akonitat, L-arginin i L-ornitin, dok je utvrđeno da *A. baumannii* ne usvaja histamin (Brenner i sar., 2005).

Acetat kao jedini izvor ugljenika mogu da koriste mnoge bakterije, uključujući i bakterije iz familije Enterobacteriaceae. Ovaj sastojak se standardno nalazi u podlogama za obogaćenje, koje su namenjene za izolaciju bakterija kompleksa *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*. Na ovoj podlozi nakon obogaćenja nisu izolovane bakterije drugih vrsta, odnosno one koje su davale lažno pozitivne rezultate preliminarnih testova korišćenih u identifikaciji, što ukazuje na visoku efikasnost ove podloge u kombinaciji sa Herella agarom. Zanimljiva je činjenica da je podloga sa acetatom kao izvorom ugljenika uzrokovala jako spor rast, jer je upravo acetat predložen kao odgovarajući supstrat za izolaciju vrste *A. baumannii* od strane Baumann (1968). U periodu od 24-48 h uvećanje je iznosilo ~120 % (1,2 puta), a ukupno uvećanje nakon 48 h je iznosilo ~140 % kada je acetat korišćen kao jedini izvor ugljenika. Upotrebom ove podloge *Acinetobacter baumannii* je izolovan iz čak četiri uzorka, od toga u jednom nakon inkubacije od 48 h, što dokazuje primenljivost acetata u ove svrhe. Nakon inkubacije od 24 h, učestalost zamućenja podloga za obogaćenje bila je najveća u podlozi sa acetatom (8 uzoraka), a zadržala se kod istog broja uzoraka i nakon 48 h što dodatno sugeriše acetat kao adekvatan sastojak podloga za obogaćenje za izolaciju *Acinetobacter baumannii*.

U svim ispitivanim uzorcima iz prirodne sredine, u direktno zasejanom uzorku od 1 mL detektovano je potencijalno prisustvo vrsta roda *Acinetobacter*, odnosno prisustvo ljubičastih, nefermentišućih kolonija na Herella agaru. Ipak, rezultati identifikacije izolata dobijenih nakon obogaćenja pokazali su odsustvo ovih bakterija u nekim uzorcima, što je zavisilo od samog uzorka, ali i korišćenih podloga za obogaćenje. Na primer, zanimljivo je spomenuti da upotrebom laktata u podlozi za obogaćenje nije izolovan ni jedan soj ovog kompleksa, iako se pored acetata i ovaj sastojak preporučuje za njihovu rutinsku upotrebu (Towner, 2006). Takođe, lažno pozitivni rezultati dobijeni prilikom izolacije na podlozi sa piruvatom ukazuju na nepouzdanost primene ove podloge. Međutim, izražena stopa rasta *A. baumannii* na podlozi sa piruvatom kao supstratom ukazuje na njegov povoljan uticaj na gajenje ove vrste, ali ne i za njenu izolaciju.

Nakon inkubacije od 24 h, učestalost zamućenja podloga za obogaćenje bila je najveća u podlogama sa acetatom, histidinom, fenilalaninom i piruvatom. Učestalost zamućenja nakon inkubacije od 48 h bila je najveća kod podloga sa histidinom, tirozinom i piruvatom, a zamućenje je uočeno kod svih uzoraka na pomenutim supstratima. Posle ovog vremena, zamućenje je bilo prisutno i kod velikog broja uzoraka na podlogama sa acetatom, alaninom, etanolom, fenilalaninom, laktatom i leucinom. Učestalost zamućenja i procenat transmisije svetlosti kod uzoraka podzemnih voda ukazuju na malu brojnost bakterija, jer zamućenje nije uočeno ni u jednom uzorku, nakon inkubacije od 24 h, ali je detektovano u uzorcima inkubiranim 48 h, što se naravno može objasniti dužim vremenom inkubacije.

Dobijeni rezultati potvrđuju sposobnost *A. baumannii* sojeva da rastu na različitim izvorima ugljenika (acetat, alanin, etanol, L-fenilalanin, L-histidin, laktat, L-leucin, piruvat ili L-tirozin). Stopa rasta je varirala u zavisnosti od jedinjenja koje je korišćeno kao supstrat. Najbrži rast *A. baumannii* je detektovan kada je korišćen tirozin kao supstrat. Alanin, L-histidin i laktat kao jedini izvori ugljenika su se takođe pokazali kao veoma pogodni supstrati, jer je intenzitet rasta *A. baumannii* takođe bio izražen. Takođe, kada posmatramo sve ispitivane supstrate, uvećanje brojnosti nakon 24 h je bilo relativno slično i kretalo se od ~118 % za piruvat do ~180 % za tirozin, a u periodu od 24-48 h uvećanje se kretalo od ~120 % za acetat, do ~424 % za piruvat. Na osnovu ovoga jasno je da je u prvih 24 h inkubacije *A. baumannii* najsporije rastao na piruvatu kao izvoru ugljenika, a najbrže na tirozinu. Takođe, u periodu 24-48 h je došlo do značajnog uvećanja intenziteta rasta na svim supstratima osim na acetatu, jer je ukupno uvećanje nakon 48 h je iznosilo ~140 % kada je acetat korišćen kao jedini izvor ugljenika. Ukupno uvećanje brojnosti ćelija na ostalim supstratima u periodu od 0-48 h kretalo se od ~180 % za etanol do ~667 % za tirozin, što sugeriše da je prilikom rasta *A. baumannii* sa jednim dostupnim izvorom ugljenika potrebna produžena inkubacija i do 48 h. Na osnovu utvrđene stope rasta *A. baumannii*, primenjeni supstrati se mogu podeliti u tri grupe: (1) supstrati visokog intenziteta rasta, i ovde spadaju L-tirozin, alanin, L-histidin i piruvat koji su u periodu 0-24 h uzrokovali uvećanje apsorbance ≥ 300 %, a nakon 0-48 h uvećanje ≥ 500 %, (2) supstrati umerenog intenziteta rasta, gde spadaju L-leucin, L-fenilalanin i laktat, sa uvećanjem apsorbance 150-300 % nakon 24 h, odnosno 200-500 % nakon 48 h, i (3) supstrati slabog intenziteta rasta *A. baumannii*, kao što su acetat i etanol, koji su uzrokovali uvećanje apsorbance ≤ 150 % nakon 24 h, odnosno ≤ 200 % nakon 48 h.

Visoka učestalost zamućenja podloga za obogaćenje sa acetatom (8 uzoraka) i fenilalaninom (7 uzoraka), nakon inkubacije od 24 h, dodatno potvrđuje uspešnost primene ovih supstanci kao sastojaka podloga za obogaćenje za izolaciju vrste *A. baumannii*. Međutim, stopa rasta ove vrste u monokulturi na podlogama sa acetatom i fenilalaninom nije bila izražena, što navodi na pretpostavku da visoka učestalost zamućenja ovih podloga je najverovatnije posledica rasta i drugih bakterijskih vrsta prisutnih u uzorku. Veliki broj uzoraka kod kojih se posle inkubacije od 24 h javilo zamućenje u podlozi sa histidinom i piruvatom je u skladu i sa detektovanom stopom rasta *A. baumannii*. Ova dva supstrata su

okarakterisana kao supstrati visokog inteziteta rasta, a podloga sa histidinom je omogućila izolaciju najvećeg broja sojeva nakon inkubacije od 48 h. Međutim, ovi rezultati ne poseduju veliki značaj usled malog broja izolovanih sojeva i/ili lažno pozitivnih rezultata. Uprkos manjoj pouzdanosti i manjem broju izolata dobijenih pri upotrebi podloga sa piruvatom i tirozinom, u odnosu na korišćenje fenilalanina i acetata, utvrđeno je da je jedan soj izolovan na podlogama sa piruvatom i tirozinom, ali ne i na podlogama sa fenilalaninom i acetatom. Kao najadekvatnija podloga za izolaciju *A. baumannii* sojeva obogaćenjem pokazala se podloga sa acetatom. Izolaciju je najbolje vršiti nakon inkubacije podloga za obogaćenje od 24 h zbog skraćenja vremena inkubacije, jer se tako smanjuje verovatnoća prenamnožavanja drugih bakterija koje mogu onemogućiti izolaciju vrsta Acb kompleksa. Vreme inkubacije od 48 h pogodno je samo kada izolacija nije uspešna nakon 24 h inkubacije. Statistički značajna razlika u uspešnosti izolacije nakon 24 i 48 h, kada se sve podloge uzmu u obzir, nije utvrđena ($P=0,579$). Osim toga, detektovan je i blagi pad intenziteta transmisije svetlosti nakon produžene inkubacije, do koga dolazi usled smanjenja količine dostupnog supstrata u podlozi.

Identifikacija molekularnim metodama i VITEK2 sistemom je potvrdila prethodno identifikovane *A. baumannii* izolate klasičnim mikrobiološkim metodama, sa izuzetkom 2 soja iz prirodne sredine, što znači da klasične mikrobiološke metode ne treba da budu zanemarene i u potpunosti odbačene, prilikom identifikacije bakterija. Zapravo ne treba se osloniti isključivo na jedan tip metoda identifikacije, već je najsigurnije koristiti kombinaciju standardnih mikrobiološko-biohemijskih i molekularno-genetičkih metoda u cilju što preciznije identifikacije sojeva do nivoa vrste, a naročito kada je u pitanju identifikacija do nivoa genomske vrste, što je slučaj sa bakterijom *Acinetobacter baumannii*. Kolekciju sojeva *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* kompleksa Katedre za mikrobiologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu čini ukupno 31 soj, od čega su pripadnici genomske vrste *Acinetobacter baumannii* tri referentna soja, dvadeset sojeva kliničkih izolata iz rana i šest izolata poreklom iz prirodne sredine, dok su dva soja iz prirodne sredine identifikovana kao pripadnici Acb kompleksa.

6.2. KARAKTERISTIKE *A. baumannii* IZOLATA

Izolati genomske vrste *Acinetobacter baumannii* iz kolekcije kultura su detaljno okarakterisani, jer poznavanje njihovih fenotipskih i genotipskih osobina omogućava bolji uvid prilikom pronalaženja adekvatnih pristupa za njihovu eradikaciju.

6.2.1. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKE

Postojanje brojnih komercijalnih prehrambenih aditiva i antibiotika za kontrolu infekcija kod ljudi često dovodi do porasta antibiotske rezistencije bakterija. *A. baumannii* je rezistentan na veliki broj antimikrobnih lekova, koji pripadaju različitim grupama i multiplo rezistentni izolati sve su učestaliji širom sveta. Infekcije koje oni izazivaju predstavljaju ozbiljan terapijski problem (Peleg i sar., 2008; Medić i sar., 2011). Detektovana osetljivost *Acinetobacter baumannii* izolata na konvencionalne antimikrobne agense u ovom radu je veoma zabrinjavajuća, ali je u saglasnosti sa trenutnom situacijom u smislu globalne ekspanzije multiple rezistencije ove vrste.

Od svih ispitivanih konvencionalnih antimikrobnih agenasa, najizraženiju antimikrobnu aktivnost pokazao je polimiksin B, koji je već pri koncentraciji $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ delovao bakteriostatski i baktericidno, a svega 22,6 % sojeva je pokazalo rezistenciju na ovaj antibiotik. Detektovana rezistencija na imipenem iz klase karbapenema je bila visoka (45,2 %). Takođe, kao relativno efikasni antibiotici pokazali su se i aminoglikozidi amikacin (61,3 %) i netilmicin (48,3 %), jer je visok procenat sojeva bio osetljiv na njegovo dejstvo, ali za razliku od polimiksina B, amikacin pokazuje veću varijabilnost u MIC i MBC vrednostima. Više od 65 % ispitivanih sojeva je rezistentno na ciprofloksacin, gentamicin i tobramicin, a više od 80 % sojeva je rezistentno na kanamicin, tetraciklin i trimetoprim/sulfametoksazol. Svi sojevi su pokazali rezistenciju na ceftriakson i hloramfenikol. Imajući u vidu činjenicu da je vrsta *A. baumannii* čest etiološki agens urinarnih infekcija, a antibiotici iz klase fluorohinolona predstavljaju najčešći izbor za tretman ovih infekcija, detektovan visok stepen rezistencije na ciprofloksacin je veoma zabrinjavajuć. Nešto niži procenat rezistencije na ove antibiotike je detektovan u radu Karlowsy i sar. (2003), dok je u studiji Medić i sar. (2011), koja se odnosi na izolate sa naših prostora, disk-difuzionom metodom utvrđeno da je taj procenat znatno viši: 100 % za ciprofloksacin i cefalosporine treće i četvrte generacije (ceftriakson, ceftazidim i cefepim), 95,6 % za kombinaciju piperacilin+tazobaktam, 94,8 % za amikacin, 88,9 % za gentamicin i 87,4 % za kotrimoksazol. Prema njihovim rezultatima rezistencija na karbapeneme je bila veoma visoka i iznosila je 67,4 % za imipenem, odnosno 64,4 % za meropenem. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa ovde dobijenim rezultatima za *A. baumannii* izolate, što svakako ukazuje na alarmantnu situaciju u smislu prisustva i širenja rezistentnih sojeva ove vrste na teritoriji Republike Srbije.

Na osnovu kriterijuma da multipla rezistencija *A. baumannii* podrazumeva rezistenciju na tri ili više antibiotika iz hemijski različitih grupa (Magiorakos i sar., 2012) ili antibiotika na koje bakterija razvija različite mehanizme rezistencije, svi *A. baumannii* izolati se mogu okarakterisati kao multiplo rezistentni. Bitno je napomenuti da je ovde uključena i klasa fenikola, tačnije antibiotik hloramfenikol, koji se prema Abbott i sar. (2013) takođe može koristiti protiv *A. baumannii* izolata, a nije naveden u ranijoj studiji Magiorakos i sar. (2012). Ovakavi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Medić i sar. (2011) kojih su takođe sve analizirane sojeve *Acinetobacter* spp. okarakterisali kao multiplo rezistentne, a slično je i sa rezultatima iz Italije (Bassetti i sar., 2008), Slovačke (Babik i sar., 2008), Grčke (Giamarellou i sar., 2008), Amerike (Ray i sar., 2010) i Kine (Jiang i sar., 2008).

Od ovde testiranih antibiotika, kao što je rečeno, najefikasniji konvencionalni antimikrobni agens pokazao se polimiksin B, koji je delovao pri veoma niskim koncentracijama. Kolistin i polimiksin B ostaju jedini alternativni antibiotici kada nema drugih na raspolaganju za lečenje infekcija uzrokovanih multiplo rezistentnim *A. baumannii* izolatima, odnosno predstavljaju poslednju liniju odbrane. Iako su se polimiksini koristili 60-tih i 70-tih godina prošlog veka, njihova upotreba je kasnije bila ograničena zbog različitih nuspojava, kao što su nefrotoksičnost i neurotoksičnost. Međutim, nedavna istraživanja su pokazala da je stepen nefrotoksičnosti mali i da nije tako uobičajen, kako se ranije smatralo, dok je neurotoksični efekat slab i slučajevi neuromuskularne blokade nisu objavljeni u novijoj literaturi (Falagas i Kasiakou, 2006). Mehanizam delovanja polimiksina B na bakterijsku ćeliju je povećanje propustljivosti ćelijske membrane, što dovodi do osmotske nestabilnosti i smrti ćelije. Pretpostavlja se da je rezistencija na polimiksine uslovljena oštećenjem spoljašnje membrane, što dovodi do sprečavanja vezivanja antibiotika za lipopolisaharide, koji su ciljno mesto delovanja. Ne treba zanemariti činjenicu da su određeni sojevi bili rezistentan i na dejstvo polimiksina B, a imajući u vidu sposobnost *A. baumannii* da brzo stiče rezistenciju moguće je da će se taj procenat i povećati.

Od fenotipskih karakteristika izolata ispitivane su i osobine važne za proces formiranja biofilma, odnosno osobine površine ćelija (hidrofobost i autoagregacija ćelija), pokretljivosti ćelija (pokretljivost pomoću pila tipa IV), sposobnost produkcije lektina i stepen adhezije ćelija za polistirensku površinu, tj. potencijal formiranja biofilma na abiotičkim površinama genovrste *A. baumannii* izolata iz rana i prirodne sredine.

Test autoagregacije (Basson i sar., 2007) korišćen je kao pokazatelj potencijala ćelija različitih sojeva da formiraju agregate. Kod bakterija koagregacija se odvija između ćelija različitih vrsta, dok autoagregacija podrazumeva agregaciju ćelija iste vrste (Shen i sar., 2005). Prema ovde dobijenim rezultatima većina *A. baumannii* izolata (83,9 %) je okarakterisana kao umereno autoagregativna, a 16,1 % izolata je okarakterisano kao izrazito autoagregativni. Utvrđeni stepen autoagregacije izolata poreklom iz humanog patološkog materijala i izolata poreklom iz prirodne sredine ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u sposobnosti ćelija sojeva različitog porekla da formiraju autoagregate ($P=0,78$).

Koljalg i sar. (1996) su u svojoj studiji pokazali da su visoko agregativni sojevi *A. baumannii* uglavnom vodili poreklo iz bolničke sredine i iz donjih delova respiratornog trakta pacijenata intenzivne nege, koji su bili podvrgnuti veštačkoj ventilaciji. Takođe, pretpostavili su da sojevi ove vrste ne menjaju svoj kapacitet agregacije prilikom ulaska u organizam radi započinjanja infekcije, već konstantno koriste ovu svoju osobinu radi adherencije u cilju preživljavanja u prirodnoj sredini i kao mikrobionti čoveka (Koljalg i sar., 1996). Navedena pretpostavka je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Osim toga, fenomeni autoagregacije i koagregacije bakterija se smatraju važnim procesima u formiranju koherentnih struktura poput biofilмова i predstavljaju rezultat grupnog ponašanja bakterija. Rezultati Shen i sar. (2005) su potvrdili da su ova dva procesa odgovorna za početne faze formiranja biofilмова, a Simões i sar. (2008) da *Acinetobacter calcoaceticus* poseduje sposobnost formiranja koagregata i autoagregata, kao važnih procesa u formiranju biofilma. Nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija između osobina autagregacije i sposobnosti produkcije biofilma *A. baumannii* kada se uzmu u obzir samo izolati poreklom iz rana ($\tau = -0,10$; $P = 0,51$) i izolati iz prirodne sredine ($\tau = 0,29$; $P = 0,32$).

Za određivanje hidrofobnosti *A. baumannii* izolata korišćen je test adhezije bakterija za ugljovodonike, tj. za n-heksadekan. Većina sojeva (80,7 %) je okarakterisana kao umereno hidrofobni, a 19,3 % sojeva je okarakterisano kao hidrofilni. Stepenn adhezije testiranih izolata za n-heksadekan se kretao od 7 do 46 %. Referentni soj ATCC 19606 je u testu sa n-heksadekanom okarakterisan kao hidrofilan, sa detektovanim stepenom hidrofobnosti koji je iznosio 18,5 %, dok je prema rezultatima McQueary i Actis (2011) hidrofobnost ovog soja u testu sa p-ksilenom iznosila 2 %. Iako postoje razlike u dobijenim vrednostima, važno je imati u vidu da na hidrofobnost može uticati niz faktora, a pre svega karakteristike medijuma. Bez obzira na ove razlike, rezultati su u skladu, s obzirom da je soj okarakterisan kao hidrofilan. Ostali *A. baumannii* klinički izolati su se veoma razlikovali u ovoj osobini, jer se stepenn adhezije za p-ksilen kretao od 12 do 90 % (McQueary i Actis, 2011). Boujaafar i sar. (1990) su takođe proučavali osobinu hidrofobnosti (tj. adheziju za ugljovodonik p-ksilen) 88 *A. baumannii* sojeva kliničkog porekla. Sojevi su bili podeljeni u dve grupe: u prvu je bilo uključeno 65 sojeva izolovanih sa različitih kliničkih uzoraka, kao što su inficirani kateteri, a u drugu grupu su bila uključena 23 soja izolovana sa kože zdravih osoba. Visok stepenn hidrofobnosti je bio zabeležen kod sojeva iz prve grupe i to 92 % u odnosu na drugu grupu gde je zabeležen nizak stepenn hidrofobnosti, samo 5 % (Boujaafar i sar., 1990). Visok stepenn hidrofobnosti (>70 %) detektovan je i kod *A. baumannii* izolata poreklom iz urinarnog trakta, a hidrofobnost kontrolnog soja PAO1 bila je slična detektovanoj hidrofobnosti *A. baumannii* uropatogenih izolata (Pour i sar., 2011). Ovi rezultati i rezultati McQueary i Actis (2011) se ne mogu direktno porediti sa ovde dobijenim rezultatima za *A. baumannii* sojeve iz rana, jer je testirana adhezija za ugljovodonik ksilen. Bitno je napomenuti da su Vanhaecke i Pijck (1988) u svom radu istakli da ksilen ne treba koristiti u BATH testu za utvrđivanje stepena hidrofobnosti, pošto je mikroskopska analiza pokazala mnogo niži indeks adhezije, a ksilen je

teško u potpunosti ukloniti i zbog toga ometa očitavanje vrednosti. I pored toga, može se primetiti da je ovde utvrđen stepen hidrofobnosti *A. baumannii* izolata bio sličan stepenu hidrofobnosti kontrolnog soja PAO1, a isto je potvrđeno i u studiji Pour i sar. (2011). Detektovana osobina hidrofobnosti se dovodi u vezu sa patogenošću, jer je uključena u adheziju bakterija za površinu eukariotskih ćelija i inertne površine (Paragioudaki i sar., 2004). Ranije je utvrđeno da je hidrofobnost ćelijske površine bakterija vrste *A. baumannii* povezana sa patogenošću, bakterijskom adhezijom i sa formiranjem biofilma (Absolon, 1988). Ipak, prema ovde dobijenim rezultatima, za sve testirane *A. baumannii* izolate, nije utvrđena statistički značajna korelacija između hidrofobnosti ćelijske površine i inicijalnog vezivanja za supstrat ($\tau = 0,20$; $P = 0,11$) u zavisnosti od njegove hidrofobnosti, odnosno hidrofilitnosti. Takođe, nije utvrđena statistički značajna korelacija između ove dve osobine *A. baumannii* ćelija, ako posmatramo odvojeno izolate iz rana ($\tau = 0,22$; $P = 0,15$) i izolate iz prirodne sredine ($\tau = 0,29$; $P = 0,32$). Imajući u vidu činjenicu da je većina ovde testiranih sojeva koja je formirala biofilm bila umereno hidrofobna, možemo pretpostaviti da hidrofobnost ipak igra značajnu ulogu u formiranju biofilma. Kempf i sar. (2012) su proučavali osobine površine ćelija sojeva *A. baumannii* i utvrdili su da je nemukoidni soj AB-NM (umereno virulentan u mišijem modelu pneumonije) znatno hidrofobniji i da je više adherirao za silikonski kateter od mukoidnog soja AB-M (visoko virulentnog u istom modelu). Soj AB-NM je produkovao znatno više biofilma od soja AB-M, čime su ovi autori dokazali da hidrofobnost ima značajnu ulogu u formiranju biofilma (Kempf i sar., 2012). Takođe, Pour i sar. (2011) su za veoma hidrofobne uropatogene *A. baumannii* sojeve detektovali i visok stepen produkcije biofilma, a dokazana je i statistički značajna razlika u poređenju sa sojevima ove vrste, koji su bili manje hidrofobni i koji su formirali biofilm u manjoj meri. Međutim, slično ovde dobijenim rezultatima za *A. baumannii* izolate iz rana, ni Mhamedi i sar. (2014) nisu utvrdili statistički značajnu korelaciju između hidrofobnosti i formiranja biofilma, kada su testirali sposobnost 30 sojeva *A. baumannii* poreklom sa medicinskih uređaja da formiraju biofilm, kao ni McQueary i Actis (2011) ispitujući adheziju na staklenu površinu soja ATCC 19606 i 8 kliničkih izolata. Na osnovu rezultata dobijenih ovde i predstavljenih u literaturi može se pretpostaviti da osobina hidrofobnosti nema presudnu ulogu u formiranju biofilma, ali da je svakako značajna za ovaj proces kod vrste *A. baumannii*. Ovakva zapažanja ukazuju na to da ćelijska hidrofobnost/hidrofilitnost ne predstavlja dobar pokazatelj stepena produkcije biofilma kod *A. baumannii*.

Pojedini autori su istakli hidrofobne interakcije kao pokretačku silu interakcije među ćelijama van tečne faze, pa čak utvrdili i direktnu korelaciju sa fenomenom agregacije (Liu i Tay, 2002; Phuong i sar., 2009), i predominaciju hidrofobnih interakcija u odnosu na autoagregaciju (Gonçalves, 2013). Prema dobijenim rezultatima za vrstu *A. baumannii*, između detektovanog stepena autoagregacije i hidrofobnosti ćelija nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija kada posmatramo sve testirane *A. baumannii* izolate ($\tau = -0,01$; $P = 0,93$). Ovakvi rezultati ukazuju na činjenicu da ove osobine nisu od presudnog značaja za

proces adhezije ćelija za polistiren, ali svakako doprinose sposobnosti ćelija genovrste *A. baumannii* da produkuje biofilm, jer svi ispitivani *A. baumannii* izolati iz rana i prirodne sredine su posedovali sposobnost autoagregacije i većina osobinu umerene hidrofobnosti.

Poznato je da vrsta *A. baumannii* poseduje sposobnost brzog širenja na površinama, kako biotičkim, tako i abiotičkim. Vrste ovog roda ne poseduju flagele, tako da je njihovo brzo širenje posledica trzajućeg, a ne plivajućeg kretanja posredovanog pilima tipa IV (O'Toole i Kolter, 1998; Clemmer i sar., 2011). Pili *A. baumannii* su kodirani *csuA/BABCDE* sistemom za sklapanje pila (eng. *csuA/BABCDE chaperone-usher pili assembly system*), koji je kontrolisan dvokomponentnim regulatornim sistemom (Luo i sar., 2015). *A. baumannii* sojevi defektni u biogenezi pila nemaju mogućnost trzajućeg kretanja, kao ni formiranja mikrokolonija (O'Toole i Kolter, 1998). Testovi za ispitivanje hidrofobnosti, autoagregacije i pokretljivosti ćelija koji su primenjeni u ovom radu su veoma važni za određivanje sposobnosti ćelija za kolonizaciju površine rane, kao i razvoj biofilma u rani, imajući u vidu poreklo sojeva korišćenih u radu. Iz tog razloga je, osim osobina autoagregacije i hidrofobnosti, testirana i sposobnost pokretljivosti *A. baumannii* sojeva, kao karakteristike uključene u proces formiranja biofilma. Trzajuće kretanje na podlozi sa 1,5 % agara je uočeno kod svih ovde testiranih *A. baumannii* izolata iz rana i prirodne sredine. Kvantifikacija kretanja izvršena je merenjem prečnika formirane zone oko mesta inokulacije na dodiru površina agar-staklo. Rezultati su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u stepenu pokretljivosti između izolata iz rana i prirodne sredine ($P=0,059$). Referentni soj ATCC 19606 je ispoljio pokretljivost pilima tipa IV sa prečnikom zone difuznog zamućenja 20,5 mm. Tomaras i sar. (2003) su takođe testirali pokretljivost ovog soja i pokazali da je nepokretan na podlogama za ispitivanje pokretljivosti rojenja, plivanja i trzanja, što nije u saglasnosti sa ovde detektovanim trzajućim kretanjem soja ATCC 19606. Međutim, isti autori su kasnije ispitivali pokretljivost ovog soja i 8 *A. baumannii* kliničkih izolata, kod kojih su transmissionom elektronskom mikroskopijom detektovali pile na površini ćelija gajenih na podlozi za ispitivanje plivajućeg kretanja sa 0,3 % agaroze. I pored detektovanog prisustva pila, ni za jedan soj nije detektovana pokretljivost na pologama za ispitivanje rojenja i trzajućeg kretanja, a kod tri klinička izolata potvrđena je pokretljivost na podlozi za ispitivanje plivajućeg kretanja (McQueary i Actis, 2011). Takođe, u ovoj studiji svi sojevi su pokazali povećanu redukciju pokretljivosti kada je koncentracija agaroze postepeno povećavana do 0,3 do 1 %, dok na podlozi sa 1,5 % agaroze nije detektovana pokretljivost (McQueary i Actis, 2011). Bitno je istaći da su ovi autori ispitivali pokretljivost pilima nakon inkubacije od 24 h na LB podlozi za trzajuće kretanje sa 1 % agaroze inokulisanom sojevima gajenim na čvrstoj podlozi, dok je ovde za utvrđivanje istog tipa pokretljivosti inkubacija trajala 48 h i korišćena je LB podloga sa 1,5 % agara, inokulisana prekonoćnim kulturama gajenim na tečnoj podlozi. Može se pretpostaviti da pomenute varijacije u uslovima prilikom ispitivanja stepena pokretljivosti *A. baumannii* sojeva mogu značajno uticati na krajnji rezultat.

Utvrđeno je da pili na površini ćelija *A. baumannii* omogućavaju bolju adherenciju za epitelijalne ćelije, što predstavlja inicijalni korak za kolonizaciju (naročito površine kao što je rana) i kasnije infekciju domaćina (Lee i sar., 2006). Produkcija pila je esencijalna za formiranje biofilma od strane ovog kliničkog patogena i sa aspekta adhezije za medicinski značajne površine od polistirena, polimera koji se najčešće koristi za proizvodnju raznih medicinskih uređaja (Gaddy i Actis, 2009). Dobijeni rezultati odnosa između *in vitro* detektovanog stepena pokretljivosti pomoću pila i sposobnosti formiranja biofilma na polistirenskoj površini ukazuju na to da pokretljivost, merena kao dijаметar zone zamućenja oko mesta uboda, nije faktor od presudnog značaja za razvoj biofilma, jer nije utvrđena statistički značajna korelacija između ovih osobina vrste *A. baumannii* ($\tau = 0,11$; $P = 0,37$). Bitna je i činjenica da je trzajuće kretanje ispitivano na dodiru površina agar-staklo, kao i da je inokulacija podloga vršena metodom uboda, što predstavlja mogući izvor varijacija u broju inokulisanih *A. baumannii* ćelija, a samim tim i detektovane pokretljivosti. Statističkom obradom rezultata nije utvrđena ni statistički značajna linearna korelacija između trzajućeg kretanja *A. baumannii* izolata i ostalih ispitivanih osobina. Iako ovde nije dokazana korelacija između pokretljivosti pomoću pila i autoagregacije ćelija ($\tau = -0,03$; $P = 0,82$), Koljalg i sar. (1996) su metodom elektronske mikroskopije utvrdili da su bakterijske ćelije sa više pila bile i visoko agregativne. Kada su ispitivane ostale fenotipske osobine značajne za proces formiranja biofilma, nije utvrđena korelacija između trzajućeg kretanja i hidrofobnosti ćelija ($\tau = 0,10$; $P = 0,44$), kao ni trzajućeg kretanja i adhezije ćelija za polistirensku površinu ($\tau = 0,11$; $P = 0,37$). Važno je napomenuti da mereni dijаметar ne mora zavisiti od broja pila na površini ćelije. Slično ovde dobijenim rezultatima, rezultati studije McQueary i Actis (2011) su pokazali da postoje značajne varijacije među osobinama svih testiranih sojeva (ATCC 19606 i 8 kliničkih izolata), koje nisu rezultovale direktnim korelacijama između fenotipa biofilma i ispitivanih osobina ćelija koje bi mogle uticati na proces formiranja biofilma na abiotičkim površinama (hidrofobnost, pokretljivost pila, prisustvo *CsuA/B* gena). Ipak, imajući u vidu rezultate drugih autora i činjenicu da su svi ovde ispitivani sojevi iz rana i prirodne sredine pokazali sposobnost trzajućeg kretanja, ne može se odbaciti mogućnost da prisustvo pila na površini ćelija ipak ima značajnu ulogu u formiranju biofilma *A. baumannii*.

Još jedna od ispitivanih osobina je sposobnost *Acinetobacter baumannii* da produkuje lektine. Ovi proteini su ubikvitarni u prirodi i mogu se osim kod bakterija, naći i kod ostalih organizama (Lis i Sharon, 2003). Mnogobrojni bakterijski sojevi poseduju sposobnost produkcije površinskih lektina najčešće u vidu fimbrija, koje predstavljaju kratke i brojne filamentozne sklopove proteinskih subjedinića. Među najbolje okarakterisanim lektinima nalazi se lektin tip I (manoza specifični), opisan kod *E. coli* (Sharon, 1987). Prvobitni naziv za lektin bio je hemaglutinin ili aglutinin, zbog njegove sposobnosti da aglutinira eritrocite. Lektini, tj. hemaglutinini su heterogena grupa proteina ili glikoproteina koji poseduju najmanje jedan ne-katalitički domen koji se reverzibilno vezuje za specifične mnosaharide ili oligosaharide (Rini, 1995). Lektini se često koriste kao alat za identifikaciju i mapiranje

šećera na ćelijskim površinama, zbog njihovih osobina aglutinacije i njihove sposobnosti da formiraju glukokonjugate (Sharon, 1977). Osnovna funkcija bakterijskih lektina je olakšavanje međusobnog vezivanja bakterijskih ćelija ili bakterija za ćeliju domaćina, što je preduslov za formiranje biofilma i bakterijsku kolonizaciju i nastajanje infekcije (Patil i sar., 2001). Upravo iz ovih razloga je ovde osim sposobnosti *Acinetobacter baumannii* da produkuje lektine, vršena i semikvantifikacija njihove produkcije i ispitivanje specifičnosti lektina ovog humanog patogena za različite krvne grupe. Za utvrđivanje stepena produkcije lektina *A. baumannii* izolata korišćen je test hemaglutinacije. Utvrđeno je da svi sojevi *A. baumannii* produkuju ekstracelularne lektine u toku 24 h rasta na 37 °C u tečnoj hranljivoj podlozi, tj. u *in vitro* uslovima. Što se tiče specifičnosti lektina *A. baumannii* prema krvnim grupama, utvrđeno je da svi izolati, kako iz humanog patološkog materijala, tako i iz prirodne sredine ispoljavaju hemaglutinaznu aktivnost prema O Rh+, A Rh+ i B Rh+ krvnim grupama. Titar ovde testiranih *A. baumannii* izolata poreklom iz rana bio je sličan titru sojeva iz prirodne sredine, i kretao se od 1:4 do 1:64, dok je Mahammed Ali (2014) takođe dokazao sposobnost hemaglutinacije pet *A. baumannii* izolata poreklom iz sputuma pacijenata sa infekcijama respiratornog trakta prema O⁺, A⁺, B⁺ i AB⁺ humanim krvnim grupama. Titar hemaglutinacije izolata iz sputuma se kretao od 1:8 do 1:128 (Mahammed Ali, 2014). Prema ovde dobijenim rezultatima nije utvrđena statistički značajna razlika između stepena produkcije lektina od strane testiranih *A. baumannii* sojeva poreklom iz humanog patološkog materijala u odnosu na izolate poreklom iz prirodne sredine (P=0,87). Fiorina i sar. (2010) su takođe koristili sposobnost hemaglutinacije da bi utvrdili stepen produkcije lektina sojeva izolovanih iz prirodne sredine i kliničkih katetera. Koristili su 3 % rastvor humanih eritrocita O i B krvne grupe, i iste krvne grupe zeca. Međutim, za razliku od ovde ispitivanih izolata, koji su svi posedovali sposobnost hemaglutinacije, u njihovom radu neki sojevi nisu doveli do hemaglutinacije, odnosno lektini nisu detektovani kod 21 % kliničkih sojeva i 23 % sojeva iz prirodne sredine. Fiorina i sar. (2010) su testiranjem specifičnosti lektina za ugljene hidrate utvrdili značajnu razliku u ovoj osobini između kliničkih sojeva i sojeva prirodne sredine. Dokazali su da klinički sojevi poseduju lektine koji se vezuju za fukoze i manozu, dok su lektini sojeva iz prirodne sredine uglavnom specifični za galaktozu i laktozu, tako da sojevi imaju afinitet prema ugljenim hidratima O i B krvne grupe, odnosno prema galaktozi i fukozi koji se javljaju kao terminalni monosaharidi na eritrocitima ovih krvnih grupa (Fiorina i sar., 2010). Ipak, u prvom izveštaju o aktivnosti lektina kod roda *Acinetobacter* hemaglutinacija je inhibirana pomoću N-acetil-D-glukoamina (Patil i sar., 2001), čime je utvrđeno da su ispitivani lektini nespecifični prema krvnim grupama, s obzirom da se ova šećerna komponenta nalazi na eritrocitima svih krvnih grupa. Ovi autori su takođe koristili test hemaglutinacije za utvrđivanje stepena produkcije lektina sojeva *Acinetobacter* spp. i potvrdili da svi sojevi *Acinetobacter* spp. produkuju površinske lektine u toku 24 h inkubacije na 37 °C (Patil i sar., 2001), što je u saglasnosti sa ovde dobijenim rezultatima za sojeve *A. baumannii*.

Nedavna istraživanja su pokazala da su formiranje biofilma, želatinazna aktivnost i sposobnost hemaglutinacije kod *A. baumannii* sojeva u vezi sa njihovom patogenošću (Cevahir i sar., 2009). Lektini kao bitni činioci u procesu formiranja biofilma i vezivanju bakterijske ćelije za tkivo domaćina, mogu predstavljati ciljne molekule u prevenciji i sprečavanju infekcija, i formiranja biofilma, naročito na ranama. Međutim, poređenjem stepena produkcije biofilma, stepena autoagregacije, kao i stepena pokretljivosti pilima, sa utvrđenim stepenom produkcije lektina nije detektovana statistički značajna linearna korelacija između ovih osobina testiranih *A. baumannii* izolata, ali je svakako bitno istaći da su svi sojevi posedovali osobine produkcije biofilma i lektina, autoagregacije, kao i trzajuće pokretljivosti. Odsustvo značajne korelacije između produkcije lektina i ostalih osobina važnih za formiranje biofilma, a na prvom mestu adhezije ove bakterije, može se objasniti činjenicom da su lektini važniji u adheziji u *in vivo* uslovima, nego u *in vitro* uslovima, u kojima je adhezija i ispitivana. Naime, šećerne komponente za koje se vezuju lektini prisutne su na površini ćelije, ali ne i na površini polistirena od kojeg su izrađene ploče u kojima je praćeno formiranje biofilma.

Dokazano je da *A. baumannii* sojevi poseduju sposobnost formiranja biofilma na različitim površinama kao što su staklo, polikarbonat, polipropilen i urinarni kateteri od silikona ili lateksa (Pour i sar., 2011). Svetlosnom i fluorescentnom mikroskopijom je utvrđeno da je formiranje biofilma veće na polikarbonatnim, nego na staklenim površinama (Pour i sar., 2011). Ovde dobijeni rezultati potvrđuju da *A. baumannii* izolati poseduju sposobnost adhezije i formiranja biofilma na polistirenskoj površini. Testirani *A. baumannii* izolati su ispoljili visok stepen adhezije za polistiren i okarakterisani su kao veoma adherentni, što je i ranije potvrđeno (McQueary i Actis, 2011). Bitno je istaći da se neki od ovih materijala široko koriste za proizvodnju medicinske opreme, a utvrđena sposobnost *A. baumannii* da preživi i perzistira na abiotičkim materijalima je povezana sa širenjem nozokomijalnih infekcija. U prilog tome ide i činjenica da obligatno aerobni karakter ovog patogena favorizuje formiranje gustih ćelijskih konglomerata na dodiru faza vazduh-tečnost (Van Pelt i sar., 1985), što može biti slučaj kod endotrahealne tube, urinarnih i venskih katetera. Ranije je utvrđeno da ćelije referentnog *A. baumannii* soja ATCC 19606 formiraju gušće agregate na dodiru faza vazduh-tečnost, nego na zidovima i dnu ploča i epruveta (Tomaras i sar., 2003). Isti autori su istakli da biofilm referentnog soja u tečnim kulturama raste prema površini, tj. u pravcu dodira faza vazduh-tečnost uz zidove ploče, što je primećeno i kod ovde testiranih izolata prilikom bojenja biofilma kristal violetom. Ovaj fenomen nije uzrokovan mešanjem i pomeranjem tečne podloge, jer su mikrotitar ploče inkubirane u stacionarnim uslovima, tako da se može pretpostaviti da je on posledica fenotipskih osobina ovog patogena (aerobnost, oksidativni tip metabolizma, prisustvo pila, hidrofobnost, adhezija, i dr.). Na osnovu ovde dobijenih rezultata može se uočiti da je stepen produkcije biofilma pojedinih izolata iz prirodne sredine niži od stepena produkcije biofilma izolata iz rana. Statističkom obradom podataka je utvrđena statistički značajna razlika u stepenu produkcije biofilma između sojeva različitog porekla ($P=0,036$). Kod *P. aeruginosa* izolata različitog porekla, kao model organizma za bakterijski

biofilm, takođe je utvrđena razlika u stepenu produkcije biofilma između sojeva različitog porekla (Saleh i Saleh, 2015). U pomenutoj studiji *P. aeruginosa* klinički izolati su formirali biofilm u većoj meri u poređenju sa izolatima iz prirodne sredine, što je u saglasnosti i sa ovde dobijenim rezultatima. Ovakvi rezultati idu u prilog činjenici da klinički izolati poseduju osobine koje favorizuju njihov rast u formi biofilma, iako nije utvrđena korelacija između ispitivanih fenotipskih osobina i stepena produkcije biofilma. Imajući u vidu da su ovde korišćeni *A. baumannii* bolnički i ambulantni izolati poreklom iz rana, utvrđena razlika u stepenu produkcije biofilma u odnosu na izolate iz prirodne sredine ukazuje na njihovu izuzetnu sposobnost adhezije i kolonizacije površine kao što je rana. Ovo sa jedne strane objašnjava zašto su infekcije rana vrstom *A. baumannii* često hronične i rekurentne, a sa druge ukazuje da infekcije rana treba tretirati kao infekcije koje su u vezi sa formiranjem biofilma.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja fenotipskih osobina vezanih za produkciju biofilma, jasno je da ni jedna od karakteristika nije presudna za formiranje biofilma i da je proces njegovog formiranja veoma kompleksan proces. Takođe, treba imati na umu da biofilm rane često formiraju i dve ili više vrsta bakterija (Dalton i sar., 2011), što čini biofilm izuzetno kompleksnom bakterijskom zajednicom.

6.2.2. GENOTIPSKE KARAKTERISTIKE

Odabrane genotipske osobine izolata utvrđene su detekcijom prisutva gena za protein Bap, PER-1 tip β -laktamazu, kao i za integrazu tipa 1 i 2, ali i utvrđivanjem sličnosti DNK profila *A. baumannii* izolata korišćenih u radu.

Bakterijski adhezin Bap (eng. *Biofilm-associated protein*), eksprimiran na površini ćelije i konzerviran među različitim kliničkim izolatima, prvi put je opisan kod *A. baumannii* soja 307-0294 od strane Loehfelm i sar. (2008), gde je pretpostavljeno da je uključen u intercelularnu adheziju, tj. da reaguje sa receptorima na drugim bakterijskim ćelijama i dovodi do agregacije. Utvrđeno je da intercelularna adhezija omogućava maturaciju biofilma nakon inicijalnog vezivanja za abiotičku površinu, ali i da produkcija Bap površinskog adhezionog proteina i pila igra ulogu u inicijaciji biofilma (Loehfelm i sar., 2008; Goh i sar., 2013). Formiranje biofilma na abiotičkim površinama od strane Bap-pozitivnih sojeva može biti inhibirano Bap antitelima, što ukazuje na direktan doprinos Bap proteina rastu kliničkih izolata *A. baumannii* u formi biofilma (Goh i sar., 2013). Skening elektronska mikroskopija biofilma je pokazala da je Bap neophodan za trodimenzionalnu strukturu i formiranje vodenih kanala na medicinski relevantnim površinama, uključujući polipropilen, polistiren i titanijum (Brossard i Campagnari, 2012). Analizom genomske DNK ovde testiranih *A. baumannii* izolata, kod svih ispitivanih sojeva utvrđeno je prisustvo *bap* gena koji kodira Bap protein. Dakle, svi analizirani *A. baumannii* izolati su u značajnoj meri formirali biofilm i posedovali *bap* gen, što je u saglasnosti sa ranijim tvrdnjama da ovaj protein ima višestruke značajne uloge u procesu formiranja biofilma, kao što su početna adhezija za abiotičke površine,

kolonizacija domaćina i stabilizacija zrelog biofilma na staklu, jer utiče na debljinu i biovolumen biofilma. Longo i sar. (2014) su pokazali da inaktivacija Bap proteina kod *A. baumannii* dovodi do destabilizacije zrelog biofilma, koja se ogledala u redukciji njegovog biovolumena i debljine, što se u budućnosti može koristiti kao ciljni molekul u eradikaciji biofilma.

In silico analiza *A. baumannii* Bap proteina je pokazala da sam protein poseduje visok stepen hidrofobnosti (Rahbar i sar., 2010). Imajući u vidu da je Bap protein izložen na površini bakterijske ćelije, može se pretpostaviti da ekspresija ovog proteina povećava ukupnu hidrofobnost ćelijske površine. Kasnije je utvrđeno da Bap protein povećava *A. baumannii* adheziju za humane bronhijalne epitelijalne ćelije i humane neonatalne keratinocite, najverovatnije tako što povećava hidrofobnost površine ćelija (Brossard i Campagnari, 2011). Kako je već istaknuto, svi ovde testirani *A. baumannii* izolati su posedovali *bap* gen, dok je *in silico* PCR pretragom kompletno sekvenciranih genoma ove vrste, deponovanih u NCBI bazi podataka, primenom istih prajmera utvrđeno prisustvo ovog gena na hromozomu svega 4 klinička izolata (F prajmer je detektovan kod 4, a R prajmer kod 26 sojeva) od 30 sojeva u bazi (13,3 %). Loehfelm i sar. (2008) su u svojoj studiji utvrdili da je ovaj protein konzervisan među 98 *Acinetobacter* sojeva. Osim toga, nedavna studija je ispitivala prisustvo Bap kod nekoliko *A. baumannii* sojeva je ukazala da je *bap* gen, veličine oko 16 kb, visoko prevalentan (90 % testiranih sojeva) i repetitivan (Goh i sar., 2013). Pretragom NCBI baze podataka, Brossard i Campagnari (2011) su pokazali da je deo *bap* gena (*Ab307bap*) prisutan u svim *A. baumannii* sekvencama genoma; međutim, kompletna sekvenca ovog kodirajućeg regiona nije prisutna u drugim sojevima. Sve ovo ukazuje na činjenicu da Bap kod genomske vrste *A. baumannii* predstavlja veoma bitan faktor u procesu formiranja biofilma, ali do danas ne postoje studije koje opisuju potencijalne faktore sredine i uslove koji bi omogućili kontrolu diferencijalne ekspresije *bap* gena.

Geni za beta laktamaze širokog spektra dejstva (ESBL) su rasprostranjene na plazmidima među članovima familije Enterobacteriaceae. Ovi enzimi obezbeđuju rezistenciju remećenjem stukture antibiotika, koji imaju zajednički element u svojoj molekularnoj strukturi- β -laktamski prsten. Procesom hidrolize, enzim laktamaza prekida i otvara β -laktamski prsten, deaktivirajući antibakterijske karakteristike molekula. PER-1 (eng. *Pseudomonas extendend resistance*) tip beta-laktamaza je prvi put detektovan u Francuskoj 1991. kod *P. aeruginosa* soja izolovanog kod pacijenta transportovanog iz Turske, a kasnije je detektovan i kod *Salmonella* spp. i *Acinetobacter* spp. u Turskoj (Vahaboglu i sar., 1997). Sojevi roda *Acinetobacter* su ubikvitarni u bolničkoj sredini zbog čega imaju čest kontakt sa ESBL kodirajućim genima, ali ovi plazmidom kodirani enzimi su kod *A. baumannii* prvi put detektovani od strane Sechi i sar. (2004). Do sada je opisano ukupno sedam PER-tipova beta-laktamaza, od kojih je kod *A. baumannii* detektovano tri tipa (PER-1, PER-5 i PER-7) (Bush i Jacoby, 2010). PER-tip enzima omogućava visok stepen rezistencije na ceftazidim, ali niži nivo rezistencije na druge cefalosporine i peniciline, dok ne poseduju efekat protiv

cefamicina i karbapenema. Ovi enzimi mogu biti inhibirani klavulonskom kiselinom, ali ne i tazobaktamom koji inhibira druge beta-laktamaze (Poirel i sar., 2005). Prema ovde dobijenim rezultatima genotipizacije *A. baumannii* izolata, prisustvo *bla*_{PER-1} gena je detektovano kod 31 % izolata, odnosno kod 40 % *A. baumannii* izolata iz rana. Sechi i sar. (2004) su detektovali prisustvo PER-1 tip β -laktamaza kod *Acinetobacter* sojeva iz 5 od 8 bolnica, odnosno kod 45,8 % sojeva (33 od 72). *In silico* PCR pretagom NCBI baze podataka primenom korišćenih prajmera, prisustvo ovog gena je detektovano na hromozomu samo jednog kliničkog soja (*A. baumannii* 1656-2) od 30 sojeva sa kompletno sekvencioniranim genomom, dok je gen *bla*_{PER-1} detektovan kod 8 kliničkih i jenog izolata (Aba-DN-Ace) iz prirodne sredine iz ovde ispitivane kolekcije. Prema ovde dobijenim rezultatima, svi ispitivani *A. baumannii* izolati su bili rezistentni na ceftriakson sa MIC vrednostima u opsegu od 16 do $>256 \mu\text{g mL}^{-1}$, pri čemu je MIC vrednost za sve izolate iz rana kod kojih je detektovano prisustvo *bla*_{PER-1} gena iznosila $>256 \mu\text{g mL}^{-1}$. Takođe, kada posmatramo rezistenciju *A. baumannii* izolata iz rana na imipenem i prisustvo gen za PER-1 tip β -laktamaza, pet izolata je ispoljilo rezistenciju i na imipenem, dok je tri izolata bilo osetljivo na ovaj antibiotik. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa tvrdnjom da ovaj gen ne obezbeđuje rezistenciju na imipenem (Nordmann i Naas, 1994), tako da je detektovana rezistencija najverovatnije posledica nekog drugog mehanizma rezistencije *A. baumannii*. Osim toga, postoje ranije studije koje ukazuju na moguću vezu između gena za PER-1 tip β -laktamaza i osobine adhezije ćelija kod sojeva *A. baumannii* (Sechi i sar., 2004; Rodriguez-Bano i sar., 2008; Lee i sar., 2006). U skladu sa tim, svih osam izolata iz rana kod kojih je detektovano prisustvo *bla*_{PER-1} gena su se pokazali kao veoma adherentni i formirali biofilm u znatnoj meri, osim soja Aba-5074 koji se pokazao kao umereno adherentan i formirao biofilm u najmanjoj meri. Međutim, kada se posmatraju svi ispitivani izolati iz rana, može se uočiti da više izolata koji ne poseduju *bla*_{PER-1} gen su formirali više biofilma od izolata koji poseduju ovaj gen. Kod izolata iz prirodne sredine je samo izolat Aba-DN-Ace posedovao *bla*_{PER-1} gen, i ovaj soj je formirao biofilm u znatnoj meri. Međutim, kada se posmatraju svi izolati iz prirodne sredine može se takođe uočiti da su sojevi koji ne poseduju ovaj gen formirali više biofilma od soja Aba-DN-Ace; tako npr. soj Aba-M-Ace, koji je formirao biofilm u najvećoj meri ne poseduje ovaj gen. Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da ovaj gen nije presudan za poboljšanu adheziju ćelija *A. baumannii* za abiotičke površine, odnosno polistiren. Osim toga ovde je utvrđena negativna statistički značajna linearna korelacija između prisustva gena za PER-1 tipa β -laktamaza i potencijala ćelija da formiraju biofilm ($\tau = -0,27$, $P = 0,033$), kao i sa osobinom hidrofobnosti ćelija ($\tau = -0,41$, $P = 0,001$). Za razliku od ovih osobina, analizom korelacije između osobine prisustva gena za PER-1 tip β -laktamaza i osobina autoagregacije ($\tau = 0,05$, $P = 0,68$) i pokretljivosti *A. baumannii* izolata ($\tau = 0,11$, $P = 0,39$) nije utvrđena statistički značajna linearna korelacija. Ovde detektovana negativna korelacija između osobine produkcije biofilma i prisutva *bla*_{PER-1} gena odgovara rezultatima studije sprovedene u Indiji, gde je od 11 PER-1 β -laktamaza pozitivnih sojeva, čak 9 bilo slabo adherentno i/ili formiralo biofilm u neznatnoj količini (Rao

i sar., 2008), a što je u saglasnosti i sa studijom Sechi i sar. (2004) gde takođe nije utvrđena značajna korelacija između prisustva *bla*_{PER-1} gena i produkcije biofilma kod 20 sojeva poreklom iz bolnica. Prema njihovim rezultatima od 16 sojeva koji su posedovali sposobnost formiranja biofilma, 5 nije posedovalo *bla*_{PER-1} gen. U studiji Rodriguez-Bano i sar. (2008) je dokazana negativna korelacija između formiranja biofilma i prisustva β-laktamaze širokog spektra delovanja *bla*_{PER-1} među *A. baumannii* izolatima, dok je nasuprot tome u drugoj studiji detektovana pozitivna korelacija između ovde dve osobine (Lee i sar., 2008). Dostupni literaturni podaci, zajedno sa ovde dobijenim rezultatima, dovode u pitanje pravu relevantnost ekspresije *bla*_{PER-1} gena u formiranju biofilma, koju su ranije detektovali Lee i sar. (2006). Prema njihovim rezultatima adhezija *A. baumannii* sojeva za plastične površine je pojačana prisustvom i ekspresijom *bla*_{PER-1} gena, iako je nerazjašnjen mehanizam koji posreduje u ovom procesu (Lee i sar., 2008). Osim toga, ovi autori su takođe istakli da je *A. baumannii* razvio sofisticirane metode vezivanja za biotičke površine kao što su epitelne ćelije. Iako mehanizam vezivanja za humane bronhijalne epitelne ćelije takođe ostaje nepoznat, utvrdili su pozitivnu korelaciju između nivoa ekspresije *bla*_{PER-1} širokog-spektra β-laktamaze gena i nivoa bakterijske adhezije i formiranja biofilma na ovom tipu ćelija (Lee i sar., 2006; Lee i sar., 2008). Utvrđena je i korelacija između ekspresije *bla*_{PER-1} gena *A. baumannii* bolničkih izolata i adhezije ćelija za kontinuiranu ćelijsku liniju heterogenih humanih epitelnih ćelija kolo-rektalnog adenokarcinoma (Caco2 linija) (Sechi i sar., 2004).

Kao što je u opštem delu istaknuto, integroni su transpozabilni genetski elementi koji poseduju sposobnost prelaska sa plazmida na bakterijski hromozom i obrnuto. Njihova insercija i isecanje posredovana je aktivnošću rekombinaza koje specifično prepoznaju određena mesta u genomu, a koje pripadaju familiji integraza. Na ovaj način integroni kao nosioci gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju omogućavaju njihov transfer i ugrađivanje u genom bakterije. *A. baumannii* genomski DNK je analizirana u cilju identifikacije integrona klase 1 i klase 2, detekcijom specifičnih gena za integraze *intI1* i *intI2*, koje su odabrane kao visokospecifične, za razliku od ostalih gena u okviru genskih kaseti, koji su varijabilni. Prema dobijenim rezultatima za multiplo rezistentne *A. baumannii* izolate, svi sojevi kako iz rana tako i iz prirodne sredine su posedovali gene za integron klase 1, dok je sedam izolata posedovao gen za integron klase 2 (Aba-8781, Aba-DTD-Tyr, Aba-DZ-Ace, Aba-DN-Ace, Aba-M-Ace, Aba-S-Ace i Aba-S-Tyr). Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa podacima dostupnim u literaturi, jer su integroni klase 1 najčešće detektovani integroni u većini studija *A. baumannii* izolata, dok su integroni klase 2 nađeni kod malog broja izolata ove vrste (Koczura i sar., 2014; Taherikalani i sar., 2011; Turton i sar., 2005; Koeleman i sar., 2001; Ploy i sar., 2000; Seward i Towner, 1999). Visoka procentualna zastupljenost integrona klase 1 u odnosu na integrone klase 2 detektovana je kod multiplo rezistentnih bolničkih izolata poreklom iz Francuske, Grčke i Češke (80 % integron 1 pozitivnih sojeva) (Ploy i sar., 2000), Irana (80 %) (Taherikalani i sar., 2011), Tajvana (71,4 %) (Huang i sar., 2008), Poljske (63,5 %) (Koczura i sar., 2014) i Velike Britanije (prisustvo

integrona klase 1 utvrđeno kod svih epidemijskih izolata, ali ne i kod sporadičnih izolata, dok prisustvo integrona klase 2 nije detektovano) (Turton i sar., 2005). Za razliku od ovde dobijenih rezultata za kolekciju *A. baumannii* sojeva i rezultata prethodno navedenih studija, u studiji Gonzalez i sar. (1998) je od ukupno 83 testirana *A. baumannii* soja poreklom iz bolnica u Čileu svega 5,1 % sojeva posedovalo *intI1* gen, dok je *intI2* gen detektovan kod čak 69,3 % sojeva ove vrste, na osnovu čega se može pretpostaviti da je *intI1* gen prisutan kod *A. baumannii* sojeva poreklom iz Evrope i Azije, dok *intI2* gen dominira među sojevima poreklom iz Južne Amerike. Osim rasprostranjenosti *intI1* i *intI2* gena, interesantno je primetiti da su svi sojevi posedovali sposobnost produkcije biofilma i gen za integrazu klase 1. Sa aspekta procesa formiranja biofilma nije dokazan značaj integrona, međutim oni svakako igraju značajnu ulogu sa aspekta povećanog stepena rezistencije bakterijskih ćelija u okviru biofilma i stoga dodatno očuvanje strukture biofilma u prisustvu odgovarajućih antibiotika. U jednoj studiji je utvrđeno da je gen za integrazu klase 1 bio eksprimiran pod različitim uslovima rasta, ali detektovana je njegova pojačana ekspresija prilikom rasta u formi biofilma (Le, 2008). Pretragom NCBI baze podataka utvrđeno je prisustvo *intI1* gena u tri kopije, ali kod svega jednog kliničkog izolata *A. baumannii* AYE (F prajmer je detektovan kod 1 soja, a R prajmer kod 10 sojeva), koji je posedovao i *bap* gen, dok prisustvo *intI2* gena nije detektovano. Bitno je istaći da su svi ovde testirani sojevi iz kolekcije kultura *A. baumannii* posedovali intergrone i u značajnoj meri bili rezistentni na veliki broj antibiotika. Ovo nije iznenađujuće, imajući u vidu da mnoge genske kasete antibiotske rezistencije obezbeđuju rezistenciju na širok spektar antibiotika (Fluit i Schmitz, 1999; Fournier i sar., 2006), kao što su na primer amikacin, gentamicin, kanamicin, ceftriakson i hloramfenikol, na koje su analizirani *A. bauamnnii* izolati u velikoj meri bili rezistentni.

Poređenjem sličnosti RAPD-PCR profila *A. baumannii* izolata je utvrđeno da su svi izolati bili klonalno različiti, čak i sojevi iz prirodnih sredina izolovani iz istog uzorka primenom različitih izvora ugljenika (npr. Aba-S-Ace i Aba-S-Tyr). Najmanji broj RAPD-PCR profila je detektovan primenom prajmera OPB-06 (svega 7 različitih obrazaca), što ukazuje na slabiji diskriminatorni kapacitet ovog prajmera. Rezultati za analizirane *A. baumannii* sojeve ukazuju da je najveći broj različitih RAPD-PCR profila (13 profila) detektovan primenom prajmera OPN-02, pri čemu je čak kod devet sojeva iz rana i kod soja NCTC 13423 detektovan isti profil, dok su kod ostalih sojeva detektovani međusobno različiti profili, što ukazuje da prajmer OPN-02 može biti okarakterisan kao najdiskriminatorniji u odnosu na ostale primenjene prajmere. Zanimljivo je primetiti da primenom prajmera OPB-11, K-15 i OPB-06 detektovan je dominantno zastupljen profil i profili slični dominantnom profilu (razlika je u prisustvu ili odsustvu jednog produkta). Dominantni profili ili profili slični dominantnom su detektovani su kod 54,8 % sojeva za prajmer OPB-11, kod 58,1 % sojeva za K-15, odnosno kod 80,7 % sojeva za prajmer OPB-06. Rezultati dobijeni primenom ova tri prajmera (OPB-11, K-15 i OPB-06) ukazuju na srodnost testiranih *A. baumannii* sojeva iz rana, ali i pojedinih izolata iz prirodne sredine. Sličan fenomen je ranije detektovan u radu

Wroblewska i sar. (2004), koji su takođe testirali *A. baumannii* sojeve iz prirodne sredine i sojeve izolovane iz cerebrospinalne tečnosti neurohirurških pacijenta sa meningitisom, ali su za RAPD-PCR analizu koristili dva prajmera DAF4 i M13. I pored toga, pretpostavka ovih autora da su sojevi iz prirodne sredine sa istim profilima kao i kod humanih izolata najverovatnije epidemiološki povezani, odgovara i ovde dobijenim rezultatima za sojeve Aba-DTD-Tyr, Aba-M-Ace i Aba-DN-Ace koji su imali iste profile kao i izolati iz rana čak primenom dva različita prajmera. Ostali izolati iz prirodne sredine su ispoljili različite RAPD-PCR profile, što sugerise da nisu srodni sa analiziranim *A. baumannii* izolatima iz rana. Svi sojevi su primenom pet prajmera, bez obzira na njihovo poreklo, grupisani u dva velika klastera (*bootstrap* vrednost 100), gde jedan klaster obuhvata 10 sojeva i drugi 21 soj. Dobijen kofenetički koeficijent korelacije (0,87) za konstruisan filogram ukazuje da sličnost između *A. baumannii* sojeva odgovarajuća, tj. realno predstavlja njihovu sličnost, jer prema Rodrigues i sar. (2002) vrednosti kofenetičkog koeficijenta korelacije iznad 0,8 ukazuju na realniju prezentaciju sličnosti među sojevima. U studiji evropskih *A. baumannii* izolata AFLP analizom sličnost među sojevima veća od 89 % ukazuje da su izolati blisko srodni i da pripadaju istom genotipu (Dijkshoorn i sar., 1996), dok je u drugoj studiji ta vrednost iznosila 87 % (Spence i sar., 2004). Prema rezultatima dobijenim RAPD-PCR analizom sojeva iz kolekcije kultura *A. baumannii* izolata, najveća detektovana sličnost iznosila je 86,7 % i to između sojeva iz rane Aba-2793 i Aba-4727. Zanimljivo je istaći da je soj Aba-4727 za razliku od Aba-2793 posedovao *bla*_{PER-1} gen, kao i da je ovaj soj okarakterisan kao izrazito autoagregativan, dok je soj Aba-2793 okarakterisan kao umereno autoagregativan. Takođe, uočljiva je i razlika u antibiotskoj rezistenciji između ova dva izolata iz rane, jer je soj Aba-4727 ispoljio rezistenciju na ciprofloksacin, za razliku od izolata Aba-2793. Na osnovu svega navedenog jasno je da su ova dva soja klonalno različita, kao i svi ostali izolati iz kolekcije kultura *A. baumannii*, bez obzira na njihovo poreklo. Klonalna različitost je potvrđena čak i za sojeve izolovane iz istog uzorka (Aba-S-Ace i Aba-S-Tyr). Ova dva izolata su se razlikovala i prema stepenu hidrofobnosti, jer je jedino Aba-S-Tyr soj okarakterisan kao hidrofilan, dok su svi ostali sojevi iz prirodne sredine okarakterisani kao umereno hidrofobni. Takođe, ova dva soja su ispoljila različite profile rezistencije na konvencionalne antibiotike iz klase aminoglikozida, jer je soj Aba-S-Tyr bio rezistentan na amikacin, a soj Aba-S-Tyr na gentamicin. Saglasnost rezultata dobijenih genotipskom i fenotipskom karakterizacijom sojeva, potvrđuje relevantnost i primenljivost RAPD-PCR metode, jer omogućava preliminaran, efikasan i brz pristup za utvrđivanje srodnosti bakterijskih izolata, čak i kada su u pitanju genomske vrste poput *A. baumannii*. Osim toga, dobijeni rezultati ukazuju da iako se kao najdiskriminativniji prajmer za analizu *A. baumannii* sojeva izdvojio OPN-02, primena većeg broja prajmera u RAPD-PCR analizi povećava diskriminativnost metode i omogućava preciznije predstavljanje srodnosti, odnosno udaljenosti sojeva prilikom konstrukcije filograma. Ben Othman i sar. (2011) su RAPD profile dobili primenom dva arbitrarna prajmera VIL1 i VIL2, koji su dali 5 i 4 grupa, redom. Ove grupe su obuhvatile sojeve *A. baumannii* dvogodišnje studije i potvrđuju

endemski status bolničkih izolata iz Tunisa (Ben Othman i sar., 2011). Rezultati ove studije se ne mogu direktno porediti sa ovde dobijenim, jer su u analizi korišćeni različiti prajmeri, ali RAPD-PCR metoda se može okarakterisati kao veoma korisna, jer omogućava preliminarnu, relativno jednostavnu i brzu detekciju u epidemiološkim istraživanjima.

6.3. NEKONVENCIONALNI ANTIMIKROBNI AGENSI

Detektovana multipla antibiotska rezistencija i fenotipske osobine koje obezbeđuju visok stepen patogenosti ispitivanih *A. baumannii* izolata nedvosmisleno ukazuju na potrebu za pronalaženjem novih rešenja za kontrolu ove bakterije.

6.3.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja uslovljena je kvalitativnim i kvantitativnim sastavom, tj udelom biološki aktivnih komponenata. Prema literaturi u etarskim uljima kima, celera, ruzmarina, žalfije, majčine dušice, korijandera, bosiljka, eukaliptusa, kleke, lavande, limuna, limunove trave, pitome nane, mandarine, narandže, bora, angelike, bergamota, dominiraju isparljiva terpenska jedinjenja iz klase mono- i seskviterpena dok su fenolna jedinjenja iz klase fenilpropanoide dominantno zastupljena u etarskim uljima cimeta, karanfilića, komorača, muskatnog oraščića, peršuna, lovora, estragona, i drugih biljaka (najčešće iz porodica Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae i Rutaceae) (Bakkali i sar., 2008). U ovom radu ispitivana je antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljaka iz porodica: Myrtaceae (mirta i eukalitus), Cupressaceae (somina, kleka, smrika, smreka, pukinja, gorska foja, primorska somina i pitoma foja), Lamiaceae (miloduh, pitoma nana, čubar, majčina dušica, timijan, vranilova trava, grčki origano, majoram, žalfija, matičnjak, lavanda, bosiljak i ruzmarin), Apiaceae (komorač, peršun i korijander) i Asteraceae (estragon i hajdučka trava). Antimikrobno delovanje ispitano je na multiplo rezistentne *A. baumannii* izolate.

Kvalitativna i semikvantitativna analiza etarskih ulja urađena je primenom GC-MS tehnike. Etarska ulja vrste *M. communis* poreklom iz Herceg Novog, Kotora i Budve klasifikovana su u hemotip koji karakteriše visok sadržaj mirtenilacetata. Bradesi i sar. (1997) su pokazali da postoji dobra korelacija između hemotipa i geografskog porekla biljke. Prema dobijenim rezultatima, etarska ulja vrste *M. communis* poreklom sa obala Crnogorskog primorja, pripadaju istom hemotipu kao i etarska ulja iz Portugalije (Pereira i sar., 2009) i Hrvatske (Jerkovic i sar., 2002). Takođe, analizirana ulja mirte sadrže značajnu količinu linalola. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa prethodnim radovima o etarskim uljima mirte iz Crne Gore (Mimica-Dukić i sar., 2010). Detektovano je postojanje neznatnih razlika u hemijskom sastavu etarskih ulja *M. communis* sa tri različita lokaliteta, a koje su najverovatnije posledica faktora, kao što je biotop (skup faktora životne sredine i mikro-životne sredine) i genetski i epigenetski faktori biljke.

GC-MS analizom dva etarska ulja *E. camaldulensis*, takođe poreklom iz Crne Gore, sa lokaliteta Herceg Novi i Bar, utvrđeno je da prema klasifikaciji Williams-a (2011) ova etarska ulja pripadaju cineol-siromašnom tipu etarskih ulja *E. camaldulensis*. Osim 1,8-cineola, detektovane su značajne količine p-cimena, kriptona, tepinen-4-ola, spatulenola i β-pinena.

Interesantno je primetiti da ovi rezultati odgovaraju rezultatima dobijenim za etarska ulja ove vrste poreklom iz Južne Floride, gde su glavne identifikovane komponente bile p-cimen (35 %), kripton (13,7 %), terpinen-4-ol (5,7 %), spatulenol (4,3 %) i cinamil-aldehid (3,7 %), sa veoma malom količinom 1,8-cineola (2,7 %) (Pappas i Sheppard-Hanger, 2000). Važno je naglasiti da je kripton prisutan kod cineol-siromašnog tipa etarskih ulja *E. camaldulensis* varijeteta iz Australije (Bignell i sar., 1996), Benina (Dellacassa i sar., 1990) i Južne Floride (Pappas i Sheppard-Hanger, 2000), što je u saglasnosti sa ovde dobijenim rezultatima. Nasuprot tome, 1,8-cineolom-bogata etarska ulja ove vrste vode poreklo iz Grčke, Pakistana, Mozambika, Nigerije i Tajvana (Tsiri i sar., 2003; Ashraf i sar., 2010; Pegula i sar., 2000; Oyedeji i sar., 1999; Shieh, 1996). Iako je hemijski sastav oba etarska ulja *E. camaldulensis* (EuHN i EuB) bio sličan, kod etarskog ulja EuB je detektovano 5 komponenti manje u odnosu na etarsko ulje iz Herceg Novog, verovatno kao posledica različitih faktora biotopa i genetskih karakteristika biljke, koji utiču na aktivaciju, odnosno inhibiciju različitih metaboličkih puteva ove aromatične biljake.

Dominantne identifikovane komponente etarskog ulja *Juniperus oxycedrus* iglica su β -mircen (34,2 %), α -pinen (20,4 %), germakren D (11,2 %) i limonen (10,5 %). Iako se etarska ulja vrste *J. oxycedrus* uglavnom karakterišu visokim sadržajem α -pinena, bez obzira na podvrstu ili poreklo (Cavaleiro, 2001; Angioni i sar., 2003; Milos i Radonic, 2000; Medini i sar., 2010; Derwich i Chabir, 2011), može se razlikovati nekoliko hemotipova ove vrste prema sadržaju ostalih komponenti koje su zastupljene u većem procentu (Boti i sar., 2006). Prema ovim autorima moguće je razlikovati tri grupe: (1) podvrsta *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* ili kada podvrsta nije naglašena, (2) podvrsta *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa*, i (3) podvrsta *J. oxycedrus* subsp. *badia*. Ovde testirano etarsko ulje lista prema utvrđenom hemijskom sastavu pripada prvoj grupi. Pored α -pinena, kod etarskih ulja ove biljne vrste iz Portugalije (Cavaleiro, 2001) i Španije (Adams i sar., 1999) dominantno je zastupljen δ -3-karen, kod etarskih ulja biljaka poreklom iz Italije (Valentini i sar., 2003) i Grčke (Adams i sar., 1999) limonen, kod etarskog ulje iz Italije (Vidrich i sar., 1992) limonen, α -terpinil acetat i β -kariofilen, kod etarskog ulja iz Grčke (Hörster, 1974) β -felandren i terpinolen, dok su kod etarskog ulja biljaka sa Sardinije (Marongiu i sar., 2003) zastupljeni germakren D i manoil-oksidi. Slično etarskom ulju iglica vrste *J. oxycedrus*, etarsko ulje šišarki vrste *Juniperus phoenicea* ispitivano u ovom radu sadržalo je α -pinen (60,89 %) kao dominantnu komponentu, ali i germakren D (8,4 %). α -pinen je takođe bio dominantna komponenta i kod etarskih ulja bobica ove vrste poreklom iz Tunisa (58,61-77,39 %) (Medini i sar., 2011; Ennajar i sar., 2009), dok je etarsko ulje iz Egipta kao dominantne komponente sadržalo α -pinen (39,30 %) i sabinen (24,29 %) (El-Sawi i sar., 2007). Postojeći podaci iz literature i podaci dobijeni u ovom radu, ukazuju na značajne razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu etarskih ulja vrsta roda *Juniperus*. Hemijskom karakterizacijom etarskih ulja šišarki i iglica osam vrsta roda *Juniperus* utvrđeno je prisustvo ukupno 77 različitih komponenti koje

čine od 92,1 do 100 % ukupnog sastava etarskih ulja kleke (rezultati ovog rada; Lesjak, 2011). Dobijene razlike u hemijskom sastavu ovih ulja su očekivane, budući da su analizirani uzorci sakupljeni na različitim lokalitetima na teritoriji Balkanskog poluostrva i da su rasli pod različitim ekološkim uslovima. Na osnovu detaljne GC-MS analize, utvrđeno je da se ispitivana etarska ulja odlikuju visokim sadržajem monoterpenkih ugljovodonika (52,1-89,9 %). Jedna od najdominantnijih komponenti, iz grupe monoterpenkih ugljovodonika, je α -pinen (2,4-76,7 %) što nije iznenađujuće, jer je poznato da je ovaj monoterpenki ugljovodonik karakterističan za četinarske vrste. Ostale dominantne komponente etarskih ulja kleke su sabinen (0-54,3 %), β -mircen (0,9-43,2 %), limonen (0-14,8 %) i 4-terpineol (0,2-17 %). Osim monoterpenkih ugljovodonika, u značajnoj količini detektovani su seskviterpeni (1,5-41,5 %), od kojih se ističe sadržaj germakrena D (0-18,1%). Ovi rezultati ukazuju da etarska ulja vrsta *Juniperus* imaju jednostavan terpenški sastav i da se mogu smatrati izvorom dominantno prisutnih mono- i seskviterpena (Lesjak, 2011). Prema podacima Shanjani i sar. (2010) etarska ulja iste biljne vrste i jedinke, izolovana istom metodom, ali iz materijala sakupljenog u različitim vegetativnim fazama, mogu se razlikovati prema prisustvu dominantne komponente α -pinena i do 5 puta. Zbog velike varijabilnosti sadržaja istih komponenti u istoj vrsti ovog roda, sastav etarskih ulja vrsta *Juniperus* ne može se koristiti kao pouzdani hemotaksonomski marker.

Hemijski sastav ulja biljaka iz porodice Lamiaceae bio je veoma raznovrstan, kako u kvalitativnom, tako i u kvantitativnom smislu. Ranija istraživanja ukazuju da su dominantne komponente etarskog ulja vrste *Hissopus officinalis* biciklični monoterpeni pinokamfon, izopinokamfon i β -pinen (Fatemeh i Hamedeyazdan, 2011), što je u saglasnosti sa hemijskim sastavom ovde korišćenog etarskog ulja ove vrste. Etarsko ulje vrste *Mentha x piperita* prema hemijskom sastavu može pripadati jednom od tri hemotipa, hemotip 1 - mentol, hemotip 2 - karvon i hemotip 3 - limonen (Džilani i Dicko, 2012). Ovde korišćeno etarsko ulje vrste *M. x piperita* prema svom hemijskom sastavu pripada hemotipu 1, jer kao dominantnu komponentu sadrži mentol (19,1 %). Dominantne komponente etarskog ulja vrste *Satureja hortensis* koje je korišćeno protiv *A. baumannii* sojeva su karvakrol (46,7 %) i γ -terpinen (32,5 %), pri čemu je karvakrol poznat po izraženoj antibakterijskoj aktivnosti. Takođe, dominantne komponente biljaka iz rodova *Thymus* i *Origanum* su fenolne komponente, timol i karvakrol, dok je eugenol zastupljen u etarskom ulju vrste *Ocimum basilicum* (Lambert i sar., 2001; Imelouane i sar., 2009; Rota i sar., 2008; Stojkovic i sar., 2013; Vagi i sar., 2005). Ove komponente su prisutne i u etarskom ulju ispitivanih biljaka *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* i *Ocimum basilicum*, dok je u etarskom ulju vrste *O. majorana* dominantna komponenta terpinen-4-ol (30-38 %). Ovde korišćeno etarsko ulje vrste *O. basilicum* je kao dominantne komponente sadržalo linalol (35,8 %), eugenol (12,8 %) i 1,8-cineol (15,7 %), što je u saglasnosti sa rezultatima Bassolé i sar. (2010), koji su prijavili eugenol (19 %) i linalol (54

%) kao dominantne komponente ovog ulja. Etarsko ulje vrste *S. officinalis* je sadržalo α -tujon (23,9 %), slično ranije analiziranim etarskim uljima iz Srbije (Lakušić i sar., 2013) i Litvanije (Bernotienė i sar., 2007). Etarsko ulje *M. officinalis* sadrži geranial (25,1 %) u najvećem udelu, kao i etarska ulja poreklom iz Alžira, koja kao dominantne komponente sadrže geranial (27,8-37,9 %) i neral (18,9-24,1 %) (Abdellatif i Hassani, 2015). Za etarsko ulje *L. angustifolia* postoje tri hemotipa na osnovu udela dominantnih komponenti: hemotip 1 – linalol, hemotip 2 – linalilacetat, i hemotip 3 – β -kariofilen (Djilani i Dicko, 2012). Ovdje ispitivano ulje *L. angustifolia* je kao glavne komponente sadržalo linalil acetat (22,29 %), linalol (21,21 %), kamfor (14,31 %) i 1,8-cineol (10,94 %), na osnovu čega pripada hemotipu 2. Etarsko ulje vrste *Rosmarinus officinalis* može se svrstati u hemotip 1, koje kao dominantnu komponentu sadrži kamfor, hemotip 2, koji sadrži 1,8-cineol ili hemotip 3 sa verbenonom kao dominantnom komponentom (Djilani i Dicko, 2012). Ulje *R. officinalis* ispitivano u ovom radu sadrži kao glavnu komponentu 1,8-cineol (44,4 %) i pripada hemotipu 2. Kao što je već istaknuto, glavni izvor 1,8-cineola (eukaliptola) je eukaliptus, ali ova komponenta se može naći u većoj ili manjoj količini i u drugim biljkama kao što su ruzmarin, žalfija, bosiljak, lavanda i njihovim etarskim uljima (Djilani i Dicko, 2012), što odgovara sastavu ovde ispitvanih ulja.

Hemijskih sastav etarskih ulja tri biljne vrste iz familije Apiaceae (*Foeniculum vulgare*, *Petroselinum crispum*, *Coriandrum sativum*) korišćenih u ovom radu se veoma međusobno razlikovao. Etarsko ulje *F. vulgare* je sadržalo E-anetol (80,1 %) kao dominantnu komponentu, slično etarskim uljima nadzemnih delova iste biljne vrste poreklom iz Portugalije (Miguel i sar., 2010), Egipta (Shahat i sar., 2011), Alžira (Zoubiri i sar., 2014) i Kine (Diao i sar., 2014). Dominantne komponente ovde korišćenog etarskog ulja vrste *P. crispum* su 1,3,8-p-mentatrien (19,9 %) i miristicin (16,8 %), pri čemu je sličan sastav utvrđen i za etarska ulja peršuna poreklom iz Estonije (p-1,3,8-mentatrien 40-44,6 %, β -felandren 15,1-16,9 % i miristicin 13-13,1 %) (Orav i sar., 2003), dok su etarska ulja peršuna iz Kine bila nešto drugačijeg sastava (miristicin 32,8 %, apiol 17,5 % i α -pinen 16,6 %) (Zhang i sar., 2006). Etarsko ulje *C. sativum* koje je testirano protiv *A. baumannii* izolata kao dominantnu komponentu sadrži linalol (73,6 %), što je u saglasnosti sa ranije objavljenim sastavom ovog ulja iz Rusije (68 % linalola) (Bakkali i sar., 2008) i Irana (40,9–79,9 % linalola) (Ebrahimi i sar., 2010).

Dva etarska ulja biljaka iz porodice Asteraceae (*Artemisia dracunculoides* i *Achillea millefolium*) su se takođe znatno razlikovala po hemijskom sastavu. Etarsko ulje *A. dracunculoides* je kao dominantne komponente sadržalo metil eugenol (72,3 %) i sabinen (12,4 %), dok je etarsko ulje *A. millefolium* takođe sadržalo sabinen (16,3 %), ali i germakren D (14,7 %) i *trans*- β -kariofilen (14,5 %). Najzastupljenije komponente etarskog ulja hajdučke trave u ranijim radovima bile su sabinen, β -pinen, 1,8-cineol, artremizija-ke-ton, linalol, α - i β -tujon, kamfor itd. (Orav i sar., 2006). Isti autori su objavili da etarska ulja ove biljne vrste poreklom iz Estonije, Mađarske, Grčke, Moldavije, Litvanije i Nemačke sadrže

monoterpenske ugljovodonike u većoj količini, dok su ulja iz Francuske, Belgije, Rusije, Jermenije, Španije i Italije bogata oksidovanim monoterpenima. Seskviterpenske komponente su takođe dominantno zastupljene u etarskim uljima hajdučke trave poreklom iz Grčke, Estonije, Moldavije i Škotske (Orav i sar., 2006). Sa aspekta hemijskog sastava prema prethodnim navodima, ovde korišćeno etarsko ulje vrste *A. millefolium* odgovara standardima Evropske Farmakopeje. Etarsko ulje vrste *A. dracunculus* koje je ovde ispitano protiv *A. baumannii* izolata razlikovalo se prema hemijskom sastavu u odnosu na etarska ulja ove vrste poreklom iz Irana (*trans*-anetol 21,1 %, *alfa-trans*-ocimen 20,6 %, limonen 12,4 % i α -pinen 5,1 %) i Turske ((*Z*)-anetol 81 %, (*Z*)-beta-ocimen 6,5 %, (*E*)-beta-ocimen 3,1 %) (Sayyah i sar., 2004; Kordali i sar., 2005).

S obzirom da su etarska ulja ispitivanih biljaka u ovom radu imala različit sastav, očekuje se i varijabilnost njihove antimikrobne aktivnosti na *A. baumannii* multiplo rezistentne sojeve iz rana.

6.4. EFEKAT NEKONVENCIONALNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA NA *A. baumannii* IZOLATE

Testirani nekonvencionalni antimikrobni agensi su ispoljili antibakterijsku aktivnost u različitoj meri. Od 39 različitih etarskih ulja i 14 biljnih ekstrakata, većina je ispoljila značajnu antimikrobnu aktivnost protiv multiplo rezistentih *A. baumannii* izolata.

6.4.1. OSETLJIVOST *A. baumannii* IZOLATA NA ETARSKA ULJA

Multiplo rezistentni izolati *A. baumannii* sve su učestaliji širom sveta i infekcije koje oni izazivaju predstavljaju ozbiljan terapijski problem. Stoga je neophodno ispitivati supstance prirodnog porekla koje poseduju antibakterijsko delovanje, među kojima prednjače sekundarni metaboliti biljaka, a posebno etarska ulja kao jedna od najčešće proučavanih grupa bioaktivnih jedinjenja. Ova jedinjenja su sastavljena od velikog broja bioaktivnih komponenti, koje određuju njihovu antimikrobnu efikasnost. Utvrđeno je da najveći deo antimikrobne aktivnosti etarskih ulja pripada oksidovanim terpenima (npr. alkoholi i fenolni terpeni), ali je pokazano da i pojedini ugljovodonici takođe ispoljavaju antimikrobne efekte (Burt, 2004; Delaquis i sar., 2002). Utvrđeno je da etarska ulja koja sadrže kao dominantne komponente aldehide i fenolna jedinjenja, kao što su cinamil-aldehid, citral, karvakrol, eugenol ili timol, poseduju najizraženiju antimikrobnu aktivnost. Nakon njih, prema stepenu antimikrobne aktivnosti slede etarska ulja sa visokim sadržajem terpenskih alkohola, dok je mnogo slabija antimikrobna aktivnost karakteristična za etarska ulja koja sadrže ketone ili estre kao dominantne komponente (β -mircen, α -tujon ili geranil acetat). Etarska ulja sa dominantnim komponentama iz klase terpenskih ugljovodonika su uglavnom neaktivna (Dorman i Deans, 2000; Inouye i sar., 2001; Nostro i sar., 2007; Carson i Riley, 1995).

Rezultati dobijeni za etarska ulja mirte sa tri različita lokaliteta crnogorskog primorja, potvrdili su ranije detektovanu antimikrobnu aktivnost etarskih ulja vrste *M. communis* (Akin i sar., 2010; Berka Zougali i sar., 2012) i ukazali na značajan bakteriostatski i baktericidni efekat ovih ulja protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata. Aktivnost tri etarska ulja *M. communis* je bila međusobno slična, bakteriostatsko (MIC) dejstvo je zabeleženo pri koncentracijama od 0,25 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a baktericidno (MBC) u opsegu koncentracija 0,71-8 $\mu\text{L mL}^{-1}$, pri čemu je razlika u MIC i MBC vrednostima bila statistički značajna. Bakterijski sojevi *A. baumannii* koji su bili najosetljiviji na dejstvo ulja mirte su referentni (ATCC 19696 i BAA-747), kao i sojevi Aba-5055, Aba-8833, Aba-3496, dok su sojevi Aba-2572 i Aba-4914 pokazali najveću otpornost. Ova dva soja su takođe pokazala rezistenciju i prema svim testiranim antibioticima, a prema utvrđenim DNK profilima bili su blisko srodni. Etarsko sulje sa lokaliteta Bar je bilo nešto aktivnije u poređenju sa druga dva ulja mirte (MyHN i MyK), verovatno kao posledica njihovog različitog hemijskog sastava. Naime,

etarsko ulje MyB je posedovalo veću količinu linalola i mirtenil-acetata i dvostruko manju količinu α -pinena, u poređenju sa preostala dva etarska ulja mirte. Postoje studije u kojima je utvrđeno da neke komponente etarskih ulja poseduju veću antimikrobnu aktivnost protiv Gram negativnih bakterija, npr. 1,8-cineol ($1,87 \text{ mg mL}^{-1}$) i linalol ($0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) protiv *E. coli* ATCC 25923, nego α -pinen (15 mg mL^{-1}) (Sonboli i sar., 2006). Štaviše, specifični sastav estarskog ulja zajedno sa sinergističkim interakcijama među komponentama etarskog ulja (Burt i sar., 2005) su verovatno najodgovorniji za razlike u antimikrobnoj aktivnosti tri etarska ulja vrste *M. communis*. Dobijeni rezultati se ne mogu porediti sa rezultatima drugih autora koji su takođe određivali MIC i MBC vrednosti etarskih ulja *M. communis*, ne samo zato što hemijski sastav etarskih ulja varira i što se generalno koriste različite metode određivanja MIC vrednosti, već i iz razloga što ne posoje podaci o efektu etarskih ulja mirte na sojeve vrste *A. baumannii*.

Testiranje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja vrste *E. camaldulensis* takođe je potvrdilo bakteriostatsku i baktericidnu aktivnost protiv svih *A. baumannii* izolata. Iako je hemijski sastav oba etarska ulja eukaliptusa (EuHN i EuB) bio sličan, prema GC-MS analizi etarsko ulje EuB je u svom sastavu imalo 5 detektovanih komponenti manje u odnosu na EuHN (α -terpinolen, α -terpineol, *trans*-karveol, α -terpenil acetat i aromadendren). Imajući u vidu da je etarsko ulje EuB ispoljilo nešto bolju antimikrobnu aktivnost u odnosu na EuHN, očigledno je da ovih pet komponenti ne igraju značajnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti ovih etarskih ulja, bar ne u koncentracijama u kojima su zastupljeni u ulju EuHN. Takođe, analizom aktivnosti pojedinačnih bioaktivnih komponenti, za komponentu terpinolen je pokazano da ne poseduje anti-*A. baumannii* aktivnost (MIC je $>32 \text{ mg mL}^{-1}$). Iako je etarsko ulje EuB pokazalo nešto bolju aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata, antibakterijski efekat oba etarska ulja eukaliptusa je bio sličan i obećavajući. Najniže koncentracije MIC i MBC vrednosti oba etarska ulja vrste *E. camaldulensis* pri kojima je detektovana antibakterijska aktivnost su $0,5 \text{ }\mu\text{L mL}^{-1}$ i $0,71 \text{ }\mu\text{L mL}^{-1}$, redom. Međutim, utvrđena statistički značajna razlika između detektovane bakteriostatske i baktericidne aktivnosti oba ulja, kao i u slučaju *M. communis*, ukazuje da je potrebno primeniti više koncentracije etarskog ulja *E. camaldulensis* u tretmanu multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja ove vrste je takođe ranije detektovana protiv Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterijskih vrsta *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus durans*, *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* (Akin i sar., 2010; Lima i sar., 2013; Owlia i sar., 2009; Rasooli i sar., 2009). Međutim, u literaturi nema podataka o antimikrobnoj aktivnosti etarskog ulja ove biljke protiv *A. baumannii* sojeva, osim nedavnog istraživanja u kome je testiran efekat ekstrakata vrste *E. camaldulensis* protiv jednog multiplo rezistentnog *A. baumannii* soja (Jazani i sar., 2012). Imajući u vidu da se

hemijski sastav etarskih ulja i biljnih ekstrakata veoma razlikuje, rezultati se ne mogu porediti.

Rezultati ispitivanja anti-*A. baumannii* efekta etarskih ulja predstavnika roda *Juniperus* pokazali su slabu aktivnost, sa izuzetkom ulja vrste *J. foetidissima* (MIC je 1-2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a MBC od 1 do $>4 \mu\text{L mL}^{-1}$). MIC i MBC vrednosti za ostala ulja su iznosile $\geq 4 \mu\text{L mL}^{-1}$, a kao posledica slabe antimikrobne aktivnosti nije utvrđena statistički značajna razlika između bakteriostatske i baktericidne aktivnosti ulja biljaka iz porodice Cupressaceae, za razliku od etarskih ulja biljaka iz porodice Myrtaceae. Etarska ulja iglica vrsta *J. sibirica*, *J. phoenicea* i *J. communis* (Fruška gora) su ispoljila bakteriostatsku aktivnost u koncentraciji 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ protiv većine testiranih multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata, dok baktericidna aktivnost nije detektovana (MBC $>4 \mu\text{L mL}^{-1}$). Neka od ovde korišćenih ulja biljaka roda *Juniperus* su ranije testirana protiv sojeva *A. baumannii* ATCC BAA747 i *E. coli* ATCC 25922, koji su ovde korišćeni (Lesjak, 2011). Neka od ovde korišćenih ulja biljaka roda *Juniperus* su ranije testirana od strane Lesjak (2011) protiv sojeva *A. baumannii* ATCC BAA747 i *E. coli* ATCC 25922 (koji je ovde korišćen kao kontrola). Antimikrobna aktivnost protiv ova dva soja je ispitivana za etarska ulja *J. phoenicea* (šišarke), *J. sabina* (iglice i šišarke), *J. foetidissima* (iglice) i *J. communis* (iglice i šišarke). Utvrđene MIC vrednosti za *J. sabina* (iglice), *J. foetidissima* (iglice) i *J. communis* (iglice) za oba soja su se kretale u opsegu koncentracija 8-16 $\mu\text{L mL}^{-1}$, dok su za ostala testirana ulja vrednosti iznosile $\geq 16 \mu\text{L mL}^{-1}$ (Lesjak, 2011). Dobijene MIC vrednosti se ne mogu direktno porediti sa ovde dobijenim vrednostima, jer nije korišćena ista metoda prilikom utvrđivanja antimikrobnog efekta (agar diluciona vs. mikrodiluciona metoda). Bitno je istaći da se etarsko ulje iglica *J. foetidissima*, koje se ovde protiv *A. baumannii* izolata pokazalo kao najefikasnije, odlikuje visokim sadržajem monoterpenskih ugljovodonika (73,2 %) i izuzetno niskim sadržajem α -pinena (3,4 %), koji je veoma zastupljen u ostalim ispitivanim vrstama kleke (Lesjak, 2011). Međutim, nizak sadržaj α -pinena (2,7 %) je detektovan i kod etarskog ulja *J. saibna* koje nije posedovalo značajnu antimikrobnu aktivnost, što ukazuje na činjenicu da su ostale monoterpenske komponente ovog ulja odgovorne za njegovu antimikrobnu aktivnost. Dominantni monoterpenski ugljovodonici u etarskom ulju iglica *J. foetidissima* su sabinen (39,9 %), γ -terpinen (10,1 %) i α -terpinen (6,7 %), gde se γ -terpinen i α -terpinen, u poređenju sa ostalim ispitivanim etarskim uljima, nalaze u najvećem procentu (Lesjak, 2011). Takođe, prema analizi sastava ovog etarskog ulja ukupni sadržaj oksidovanih monoterpena je najviši u poređenju sa ostalim etarskim uljima kleke i iznosi 18,6 %, od kojih je najzastupljeniji 4-terpineol (17 %) (Lesjak, 2011). Visok stepen detektovane rezistencije kod *A. baumannii* izolata na etarska ulja vrsta roda *Juniperus* je iznenađujuć, imajući u vidu da je prethodno utvrđena osetljivost ove bakterijske vrste. Filipowicz i sar. (2003) su utvrdili dobar efekat etarskog ulja šišarki *J. communis* na bakterijsku vrstu *A. baumannii*, gde je minimalna inhibitorna koncentracija iznosila 0,8 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Prema rezultatima drugih autora koji su

takođe ispitivali etarska ulja različitih vrsta kleke (*J. drupacea* Labill., *J. oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sm.) Ball, *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* i *J. phoenicea* L.) protiv Gram negativnih bakterija, etarska ulja šišarki (MIC* 1,3-8,6 mg mL⁻¹, ~ 1,2-7,7 µL mL⁻¹) su ispoljila bolji efekat na sojeve vrsta *E. coli* i *P. aeruginosa* u odnosu na etarska ulja iglica (MIC >9 mg mL⁻¹, ~8,1 µL mL⁻¹) istih biljaka (Stassi i sar., 1996). Međutim, ovde detektovana aktivnost ispitivanih etarskih ulja iglica vrsta *J. sibirica*, *J. phoenicea* i *J. communis* (Fruška gora), bila je bolja od aktivnosti šišarki istih. Takođe, ovi autori su utvrdili da je etarsko ulje vrste *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* bilo najefikasnije (MIC 1,3-2,2 mg mL⁻¹, odnosno ~ 1,2-2 µL mL⁻¹). Prema ovde dobijenim rezultatima etarska ulja iglica i šišarki vrste *J. oxycedrus* ispoljila su aktivnost samo protiv referentnih sojeva *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* ATCC 25923 koji su korišćeni kao kontrola, odnosno detektovana je slabija antibakterijska aktivnost ulja iglica i šišarki vrste *J. oxycedrus* u odnosu na ostala etarska ulja biljaka ovog roda. Uočene razlike među ovde dobijenim rezultatima i rezultatima iz literature se mogu objasniti činjenicom da je ovde analizirana efikasnost etarskih ulja biljaka roda *Juniperus* protiv Gram negativnih multiplo rezistentnih izolata *A. baumannii*. Osim toga, Stassi i sar. (1996) su utvrdili da je za antimikrobni efekat najaktivnijeg etarskog ulja *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* poreklom iz Grčke, ogovorna komponenta α-terpineol (88,4 %). Najdominantnija komponenta ovde testiranih etarskih ulja roda *Juniperus*, takođe poreklom sa Balkanskog poluostrva, je α-pinen (23,7-76,7 %) za koji je potvrđeno da ima slabiju antimikrobnu aktivnost u odnosu na druge komponente etarskih ulja (Sonboli i sar., 2006).

Navedeni rezultati iz literature i ovde dobijeni rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti etarskih ulja biljaka roda *Juniperus*, ukazuju na velike razlike u njihovom kvalitativnom i kvantitativnom sastavu, pa tako i u antimikrobnoj aktivnosti. Osim toga, etarska ulja vrsta ovog roda nisu ispoljila visoku anti-*Acinetobacter baumannii* aktivnost, što ih čini neadekvatnom opcijom za borbu protiv multiplo rezistentnih izolata ove vrste.

Etarska ulja biljaka porodice Lamiaceae su takođe tesitrana protiv *A. baumannii* izolata, a ranije je potvrđena antibakterijska i antifungalna aktivnost biljaka ove porodice (*Melissa officinalis*, *Mentha aquatica*, *Mentha longifolia*, *Mentha x piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*) takođe poreklom sa teritorije Republike Srbije (Mimica-Dukić i Božin, 2007; Božin i sar, 2006).

Vrsta *Hyssopus officinalis* je poznata kao kulinarska i medicinska biljka stotinama godina, a korišćena je za lečenje kašlja, bronhitisa, astme, reumatizma, rana, čireva i tumora (Bown, 1995). Etarsko ulje ove vrste se široko koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Rezultati ovog rada su pokazali da takođe poseduje antimikrobnu

* Radi lakšeg poređenja rezultata objavljenih u literaturi sa ovde dobijenim vrednostima, koncentracije su preračunate u jedinice korišćene u ovom radu (µL mL⁻¹), a kao prosečna gustina etarskih ulja uzeta je vrednost 0,9 g mL⁻¹.

aktivnost protiv *A. baumannii* izolata najčeće pri koncentraciji od 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Bakteriostatski efekat ovog ulja je zabeležen u posegu koncentracija 2,83-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja ove vrste je i ranije detektovana (Kizil i sar., 2010; Ozer i sar., 2006). Ozer i sar. (2006) su antimikrobni efekat protiv *A. baumannii* soja detektovali pri koncentraciji od 62,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ etarskog ulja *Hyssopus officinalis*. Jasno je da su ovde dobijeni rezultati antibakterijske aktivnosti znatno bolji, jer je najviša MIC vrednost protiv multiplo rezistentnih sojeva bila 15 puta manja od MIC vrednosti koju su dobili Ozer i sar. (2006). Dominantne komponente etarskog ulja iz Turske su pinokarvon (36,3 %), izopinokamfon (19,6 %), β -pinen (10,6 %), 1,8-cineol (7,2 %) i pinokamfon (5,3 %), dok su dominantne komponente ovde korišćenog etarskog ulja vrste *Hyssopus officinalis* izopinokamfon (50,7 %) i α -pinen (9,1 %). Prema rezultatima de Rapper i sar. (2013) etarsko ulje *H. officinalis* sa visokim sadržajem izopinokamfona (48,7 %) i pinokamfona (15,5 %) je protiv sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27858 i *S. aureus* ATCC 6538 ispoljilo antibakterijski efekat pri koncentraciji 2 i 3 mg mL^{-1} ($\sim 1,8$ i $2,7 \mu\text{L mL}^{-1}$), redom. Literaturni podaci i dobijeni rezultati su u saglasnosti, što ukazuje da su etarska ulja vrste *Hyssopus officinalis* poseduju antimikrobnu aktivnost u određenom stepenu, ali nedovoljnu u poređenju sa drugim testiranim etarskim uljima koja su takođe ostvarila bakteriostatski i baktericidan efekat protiv *A. baumannii* sojeva. Važno je napomeuti da prema farmaceutskim standardima, *H. officinalis* predstavlja opasno etarsko ulje, jer ispoljava sposobnost inicijacije grčeva, čak i kada se primenjuje u malim ponovljenim dozama (Braun i Choen, 2010). Dva toksična ketona pinokamfon i izopinokamfon su uzrokovali epilepsiju i zato ovo ulje ostaje na listi opasnih ulja. Tisserand i Young (2014) ne preporučuju da se ovo etarsko ulje uzima oralno, a generalno se ne preporučuje korišćenje ovog ulja ni na koji način (Braun i Choen, 2010). Sve navedeno čini ovo ulje adekvatnim samo za primenu u hemijskim formulacijama za dezinfekciju, ali ne i za *in vivo* upotrebu.

Etarsko ulje pitome nane (*Mentha x piperita*) je jedno od etarskih ulja koje je među najčešće dostupnim komercijalno proizvedeni etarskim uljima (Brown, 1995). Osim njegove široke upotrebe u ishrani i biljnim čajevima, medicinska primena ovog ulja datira još od davnih vremena, zbog njegovog antiinflamatornog, antispazmolitskog, diaforetskog, analgetskog, stimulatornog i anti-kataraktnog efekta. Takođe se koristi protiv mučnine, za lečenje bronhitisa, anoreksije, ulceroznog kolitisa i oboljenja jetre. Etarska ulja pitome nane najčešće imaju spoljašnju primenu kao antipuritik, za zarastanje rana, antiseptik, ali se primenjuju i u antimikrobne svrhe, kao i za tretman neuralgija, glavobolja i migrena (Brown, 1995). Ovde testirano etarsko ulje vrste *Mentha x piperita* je ispoljilo antibakterijski efekat sličan efektu etarskog ulja *Hyssopus officinalis* protiv *A. baumannii* izolata. Hammer i sar. (1999) su agar-dilucionom metodom detektovali antibakterijsku aktivnost etarskog ulja *Mentha x piperita* (MIC 0,5 %, v/v; odnosno 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) i *Mentha spicata* (MIC 0,25 %, v/v; odnosno 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$) protiv referentnog soja *A. baumannii* NCTC 7844, dok je prema ovde dobijenim rezultatima etarsko ulje vrste *M. x piperita* ispoljilo antibakterijsku aktivnost

(bakteriostatsku i baktericidnu) pri višim koncentracijama, tj. 2-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. de Rapper i sar. (2013) su takođe mikrodilucionom metodom utvrdili antibakterijsku aktivnost *M. x piperita* etarskog ulja protiv sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27858 i *S. aureus* ATCC 6538, gde su utvrđene MIC vrednosti 2 i 4 mg mL^{-1} ($\sim 1,8$ i $3,6 \mu\text{L mL}^{-1}$), redom. Dominantne komponente ovog ulja bile su mentol (47,5 %) i menton (18,6 %) (de Rapper i sar., 2013), a ranije analize sastava etarskog ulja *M. x piperita* takođe ukazuju da su ove komponente doimantne (Chalchat i sar., 1997; Sivropoulou i sar., 1995). Kao što je već istaknuto, ovde testirano etarsko ulje pripada hemotipu 1 jer sadrži mentol kao dominantnu komponentu. Međutim, utvrđeno je da komponenta mentol poseduje slab antibakterijski efekat pri koncentraciji 5 μL po disku protiv *Salmonella* Typhimurium i *Rhizobium leguminosum* (Sivropoulou i sar., 1995), dok je inhibitorna koncentracija ove komponente iznosila 10 μL protiv vrsta *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Pullorum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* i *Comamonas terrigena* (Deans i Svoboda, 1988). Osim mentola (19 %), menton (41,1 %) i izomenton (11,9 %) su takođe dominantne komponente ovde ispitivanog etarskog ulja vrste *M. x piperita*, što ukazuje da su verovatno ove bioaktivne komponente najodgovornije za detektovanu umerenu anti-*Acinetobacter baumannii* aktivnost, koja predstavlja samo još jednu potvrdu komercijalne upotrebe ovog etarskog ulja.

Veoma dobru aktivnost je ispoljilo etarsko ulje vrste *Satureja hortensis*, jer su se utvrđene MIC i MBC vrednosti ovog ulja kretale u opsegu koncentracija od 1 do 2,83 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Biološka i farmakološka ispitivanja opravdavaju tradicionalnu primenu *S. hortensis* kao prirodnog izvora komponenti za konzervaciju hrane, kao i za tretman oboljenja poput inflamatornih bolesti, grčeva, bola u mišićima, mučnine, dijareje i različitih infektivnih bolesti (Leporatti i Ivancheva, 2003). Antibakterijska aktivnost ovog etarskog ulja je već ranije detektovana protiv Gram pozitivnih (MIC 0,05-0,39 $\mu\text{L mL}^{-1}$) i Gram negativnih (MIC 0,025-0,78 $\mu\text{L mL}^{-1}$) bakterija dilucionom metodom (Mihajlov-Krstev i sar., 2010). Etarsko ulje vrste *S. hortensis* u studiji Mihajlov-Krstev i sar. (2010) je ostavilo bolji efekat, zato što je ulje testirano protiv referentnih sojeva različitih bakterijskih vrsta, koji su generalno osetljiviji u odnosu na multiplo rezistentne izolate vrste *A. baumannii* poreklom iz humanog patološkog materijala. Većina autora smatra da je antimikrobni efekat etarskog ulja *S. hortensis* posledica visokog sadržaja komponente karvakrol (Dorman i Deans, 2000; Di Pasqua i sar., 2007). Tako su na primer MIC vrednosti za etarsko ulje *S. hortensis*, koje su analizirali Saghi i sar. (2014) i koje je ispoljilo antibakterijsku aktivnost protiv *A. baumannii* izolata, iznosile 0,2-0,5 mg mL^{-1} ($\sim 0,2$ - $0,45 \mu\text{L mL}^{-1}$), a kao dominantne komponente sadržalo je karvakrol (90,9 %) i p-cimen (3,1 %). Ovde korišćeno etarsko ulje iste vrste je kao glavne komponente sadržalo takođe karvakrol u dva puta nižoj koncentraciji (46,7 %), ali i γ -terpinen (32,5 %), što navodi na pretpostavku da su upravo ovde dve komponente najodgovornije za detektovanu antibakterijsku aktivnost ovog etarskog ulja protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata. Na osnovu utvrđene bakteriostatske aktivnosti etarskog

ulja *S. hortensis*, kao i navedenih literaturnih podataka i njegove tradicionalne primene, jasno je da ovo ulje može predstavljati potencijalni alternativni anti-*A. baumannii* agens za tretman multiplo rezistentnih sojeva.

Kroz istoriju, nadzemni delovi biljke i isparljive komponente vrsta roda *Thymus* se preporučuju i često koriste kao biljni čajevi, dodaci jelima i začini, kao i u različite medicinske svrhe (Stahl-Biskup i Saez, 2002). Mnoge etno-medicinske karakteristike se pripisuju njihovim infuzima, losionima i etarskim uljima nadzemnih delova biljaka roda *Thymus* zbog njihove karminativne, digestivne, antispazmolitičke, antimikrobne, antioksidativne, antiviralne i anti-inflamatorne aktivnosti (Ghasemi, 2009). Etarsko ulje vrste *Thymus serpyllum* je, kao i etarsko ulje vrste *Satureja hortensis*, ispoljilo značajnu antimikrobnu aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata pri MIC vrednostima u opsegu 1,41-2,83 $\mu\text{L mL}^{-1}$, takođe i MBC vrednosti su detektovane u pomenutom opsegu koncentracija. U jednoj studiji ispitivana je aktivnost ova dva etarska ulja protiv 75 multiplo rezistentnih *A. baumannii* kliničkih izolata, gde su utvrđene MIC vrednosti za etarsko ulje majčine dušice iznosile 0,3-0,6 mg mL^{-1} ($\sim 0,3\text{-}0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$) (Saghi i sar., 2014). Ovi autori su odredili i hemijski sastav etarskih ulja, gde su kao dominantne komponente detektovani timol (28,8 %) i karvakrol (23,5 %). Prema hemijskom sastavu etarskog ulja *T. serpyllum*, koje je ovde korišćeno protiv *A. baumannii* izolata, dominantne komponente su timol (37,1 %), γ -terpinen (8,7 %), p-cimen (8,1 %), timol metil etar (5,8 %) i karvakrol (3,1 %), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora i ukazuje da je komponenta timol u najvećoj meri odgovorna za detektovanu anti-*A. baumannii* aktivnost etarskog ulja *T. serpyllum*. Međutim, osim timola, ostale komponente prisutne u ovom etarskom ulju, ali u manjoj količini, verovatno utiču na njegov ukupan antimikrobni efekat. Na primer, za komponente p-cimen i karvakrol je u kombinaciji dokazano da p-cimen olakšava ulazak karvakrola u ćeliju. Naime, p-cimen kao hidrofilni prekursor karvakrola, uzrokuje širenje citoplazmatske membrane nakon što se ugradi u nju (Ultee i sar., 2002). Detektovana antimikrobna aktivnost etarskog ulja *T. serpyllum* protiv *A. baumannii* zajedno sa njegovom tradicionalnom upotrebom, sugeriše da ovo etarsko ulje treba uzeti u razmatranje kao alternativni prirodni antimikrobni agens.

Antibakterijska aktivnost etarskog ulja još jedne biljke iz roda *Thymus*, vrste *Thymus vulgaris*, detektovana je već pri koncentraciji 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Bakteriostatska aktivnost ovog ulja protiv *A. baumannii* izolata je postignuta pri koncentracijama u posegu 0,25-2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, dok je za postizanje baktericidne aktivnosti koncentracija etarskog ulja bila u opsegu 0,5-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Prema ranije objavljenim rezultatima u literaturi, etarsko ulje *T. vulgaris* je protiv bakterijske vrste *S. aureus* ispoljilo antibakterijsku aktivnost pri MIC vrednosti 0,1 % (0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$), odnosno MBC vrednosti 0,3 % (0,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$), dok je protiv *E. coli* MIC vrednost istog etarskog ulja iznosila 0,3 % (0,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$), a MBC vrednost 0,5 % (0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) primenom dilucione metode u hranljivom bujonu, dok je za analizu anti-*A. baumannii* aktivnosti ulja korišćena podloga Mueller Hinton bujon (Mohsenzadeh, 2007). Takođe, ranije

utvrđene MIC vrednosti etarskog ulja *T. vulgaris* protiv Gram pozitivnih bakterija iznosile su 1,3-2,7 mg mL⁻¹ (~ 1,2-2,4 µL mL⁻¹), a protiv Gram negativnih 0,3-1,3 mg mL⁻¹ (~ 0,3-1,2 µL mL⁻¹) (Imelouane i sar., 2009), što je u skladu sa rezultatima dobijenim za ovde ispitivane Gram negativne multiplo rezistentne izolate. Rezultati de Rapper i sar. (2013) su potvrdili antimikrobnu aktivnost etarskog ulja *T. vaugaris*, čije su glavne komponente bile p-cimen (29,9 %), timol (20,7 %) i γ-terpinen (8,3 %), protiv sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27858 i *S. aureus* ATCC 6538, a utvrđene MIC vrednosti su iznosile 3,3 i 2 mg mL⁻¹ (~ 3 i 1,8 µL mL⁻¹), redom. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljaka roda *Thymus* je najverovantije u vezi sa fenolnim komponentama timol i karvakrol (Consentino i sar., 1999; Davidson i Naidu, 2000). Terpinen-4-ol iako je slabije zastupljen u ispitivanom etarskom ulju, poznato je da poseduje vrlo efikasne antibakterijske osobine (Carson i Riley, 1995). Hemijska analiza sastava etarskog ulja *T. vulgaris* je pokazala da su glavne komponente timol (48,9 %) i p-cimen (19 %) (Stojkovic i sar., 2013; Rota i sar., 2008; Hudaib i sar., 2002), što je u saglasnosti sa ovde korišćenim etarskim uljem ove vrste, koje kao dominantne komponente sadrži timol (48,1 %), p-cimen (29,5 %) i karvakrol (6,0 %). Generalno postoje tri hemotipa *T. vulgaris* ulja timol (hemotip 1), tujanol (hemotip 2) i linalol (hemotip 3), a etarsko ulje korišćeno u ovom radu za tretman bakterijskih sojeva pripada hemotipu 1 i poseduje izraženu anti-*A. baumannii* aktivnost, zbog čega može predstavljati adekvatnu alternativu konvencionalnim antimikrobnim agensima.

Biljna vrsta *Origanum vulgare*, kao i podvrste *O. vulgare* subsp. *vulgare* i *O. vulgare* subsp. *hirtum* se široko koriste kao arome u tradicionalnom i modernom kulinarstvu, naročito na jugu Italije (Campania), gde rastu divlje populacije ovih podvrsta. Osim toga, ove vrste se koriste i u etnomedicini, a detektovana je njihova antimikrobna, antioksidativna, insekticidna, antitumorska i antispazmotska aktivnost (Chishti i sar., 2013). Ovde dobijeni rezultati ukazuju da etarsko ulje vrste *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* poseduje značajnu anti-*Acinetobacter baumannii* aktivnost, koja obuhvata i bakteriostatski i baktericini efekat, detektovanu u opsegu koncentracija od <0,125 do 2 µL mL⁻¹. Rosato i sar. (2010) su antibakterijski efekat ovog ulja detektovali pri koncentraciji 60 mg mL⁻¹ (~ 54 µL mL⁻¹) protiv referentnog soja *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, kao i protiv ostalih ispitivanih bakterijskih vrsta. U drugoj studiji, u kojoj su autori analizirali antimikrobnu aktivnost etarskih ulja *Origanum vulgare* i *Thymus vulgaris* protiv *S. aureus* i *S. Typhimurium* MIC vrednost je iznosila 0,5-1 µL mL⁻¹ (Stojkovic i sar., 2013). Hemijskom analizom sastava etarskih ulja utvrđeno je da je etarsko ulje *O. vulgare* bogato karvakrolom (64,5 %), p-cimenom (10,9 %) i γ-terpinenom (10,8 %) (Stojkovic i sar., 2013; Tian i Lai, 2006; Masood i sar., 2007). Etarsko ulje *O. vulgare* subsp. *vulgare* koje je ovde korišćeno za utvrđivanje anti-*A. baumannii* efekta je kao glavne komponente sadržalo kariofilen oksid (15,6 %), karvakrol (8,4 %), spatulenol (6,9 %), sabinen (6,8 %) i *trans*-β-kariofilen (5,2 %). Hemijski sastav etarskog ulja *O. vulgare* koje je ovde testirano je od posebnog interesa, jer je ovo

etarsko posedovalo značajan anti-*A. baumannii* efekat u poređenju sa ostalim testiranim etarskim uljima u ovom radu.

Veliki broj studija je pokazao da je *O. vulgare* subsp. *hirtum* veoma varijabilan takson prema svojim morfološkim i hemijskim karakteristikama (Kokkini i sar., 1997), a glavne fenolne komponente etarskih ulja ove biljke prema rezultatima Russo i sar. (1998) su timol i karvakrol, dok je ovde korišćeno etarsko ulje kao glavne dominantne komponente sadržalo karvakrol (71,1 %) i γ -terpinen (8,4 %). Russo i sar. (1998) su za etarska ulja vrste *O. vulgare* subsp. *hirtum* poreklom iz južne Italije, a na osnovu njihovog fenolnog sastava utvrdili četiri hemotipa: (1) hemotip timol, (2) hemotip karvakrol, (3) timol/karvakrol hemotip i (4) karvakrol/timol hemotip, pri čemu je većina uzorka pripadala hemotipu 1 (timol). Kokkini i sar. (1997) su ispitivali etarska ulja iste vrste, ali poreklom iz Grčke, i utvrdili da su etarska ulja biljaka iz severne Grčke bogata timolom, dok su ona iz južnih delova zemlje bogata karvakrolom. Ovde korišćena etarska ulja prema svom hemijskom sastavu takođe pripadaju hemotipu 2 (karvakrol), kao i etarska ulja poreklom iz Bugarske (Konakchiev i sar., 2004). Može se pretpostaviti da je upravo karvakrol odgovoran za detektovanu značajnu antibakterijsku aktivnost ovog ulja protiv *A. baumannii*, a u prilog tome idu i rezultati dobijeni za bakteriostatsku aktivnost bioaktivnih komponenti gde γ -terpinen nije posedovao ovu aktivnost čak ni pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji, dok je za razliku od njega karvakrol posedovao najizraženiju antimikrobnu aktivnost u odnosu na preostalih deset testiranih bioaktivnih komponenti (videti poglavlje 5.3.4). Takođe, uzimajući u obzir sva ovde testirana etarska ulja, prema dobijenim rezultatima najbolju antibakterijsku aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata ispoljilo je upravo etarsko ulje vrste *O. vulgare* subsp. *hirtum*. Kod čak 10 *A. baumannii* izolata MIC vrednost je bila manja od $0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$, dok je MBC vrednost iznosila od $<0,125$ do $4 \mu\text{L mL}^{-1}$. U jednoj studiji je ispitivana antibakterijska aktivnost tri etarska ulja vrste *O. vulgare* subsp. *hirtum* protiv 10 bakterijskih vrsta, pri čemu su se MIC vrednosti za Gram pozitivne vrste rodova *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus* kretale u posegu $25-100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\sim 0,02-0,09 \mu\text{L mL}^{-1}$), a za Gram negativne vrste rodova *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas* i *Salmonella* MIC vrednosti su varirale od 50 do $>100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\sim 0,05-0,09 \mu\text{L mL}^{-1}$) (De Martino i sar., 2009). Veće MIC vrednosti za Gram negativne bakterije koje su dobili De Martino i sar. (2009) su u skladu sa ovde dobijenim rezultatima za multiplo rezistentne sojeve *A. baumannii*.

Origanum majorana je endemična medicinska biljka sa Kipra, čija se etarska ulja koriste kao diuretik i za lečenje astme, a koristi se i kao začim i aroma u sosevima i različitim prehrambenim proizvodima (Chishti i sar., 2013). Bakteriostatska i baktericidna aktivnost etarskog ulja vrste *O. majorana* detektovana je u opsegu koncentracija od 2 do $2,83 \mu\text{L mL}^{-1}$ protiv *A. baumannii*. Prema rezultatima drugih autora MIC vrednosti ulja *O. majorana* protiv četiri *A. baumannii* izolata i referentnog soja NCTC 7844 su iznosile 0,125-0,5 % ($0,1-0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$) (da Costa i sar., 2009; Hammer i sar., 1999), a prema rezultatima de Rapper i sar.

(2013) MIC vrednosti *O. majorana* etarskog ulja protiv sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27858 i *S. aureus* ATCC 6538 su iznosile 2 mg mL⁻¹ (~ 1,8 µL mL⁻¹), a njegove glavne komponente bile su 1,8-cineol (46 %) i linalol (26,1 %). Međutim, dominantne komponente u etarskim uljima biljaka *O. majorana* objavljene u dostupnoj literaturi su terpinen-4-ol (30-38 %), p-cimen (7-9 %), linalol (12 %), γ-terpinen (3-14 %) i γ-terpineol (4-5 %) (Vera i Chane-Ming, 1999; Vagi i sar., 2005), dok su u ovde testiranom etarskom ulju dominantne komponente bile terpinen-4-ol (23,3 %), γ-terpinen (15,9 %), α-terpinen (11 %) i *trans*-sabinen hidrat (6,8 %). Umerena antibakterijska aktivnost etarskog ulja *O. majorana* i to protiv multiplo rezistentnih izolata je najverovatnije posledica aktivnosti dominantne komponente terpinen-4-ol i/ili njene sinergističke aktivnosti sa ostalim komponentama prisutnim u etarskom ulju ove vrste.

Etarsko ulje vrste *Salvia officinalis* se koristi u tradicionalnoj medicini, ali i farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Ovo ulje je ispoljilo anti-*A. baumannii* aktivnost u širokom opsegu koncentracija od 0,35 do 4 µL mL⁻¹ za MIC, odnosno MBC vrsnosti od 0,5 do 4 µL mL⁻¹. Ovakvi rezultati su značajni jer ranije nije testirana aktivnost ovog etarskog ulja protiv *A. baumannii* sojeva. *S. officinalis* etarsko ulje poreklom iz južnog Brazila je ispoljilo antibakterijsku aktivnost protiv vrsta *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. Typhimurium*, *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter* sp., *Serratia marcescens*, *Bacillus megatherium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Staphylococcus aureus* i *S. epidermidis* pri MIC vrednostima 0,1-10 mg mL⁻¹ (Longaray Delamare i sar., 2007), dok je etarsko ulje takođe sa prostora Republike Srbije ispoljilo antifungalnu aktivnost u koncentraciji 15-250 µL mL⁻¹, a ako dominantne komponente sadržalo je α-tujon (19,9 %) i kamfor (18,9 %) (Bozin i sar., 2007). Etarsko ulje iz Brazila je sadržalo α-tujon (24,8 %), 1,8-cineol (14,8 %), borneol (11,1 %) i kamfor (10,9 %), dok je ovde testirano ulje kao dominantne komponente posedovalo takođe α-tujon (23,9 %), kamfor (17,9 %), 1,8-cineol (14,6 %), i u manjoj količini kamfen (7,4 %) α-pinen (6,8 %) i β-tujon (5,3 %), što je verovatno imalo kao posledicu izraženiju antimikrobnu aktivnost ovog etarskog ulja testiranog protiv *A. baumannii* sojeva. Etarsko ulje *S. officinalis* poseduje anti-*A. baumannii* aktivnost, i može se koristiti za dezinfekciju abiotičkih površina.

Etarsko ulje matičnjaka (*Melissa officinalis*) je dobro poznat antibakterijski i antifungalni agens, koji je takođe odgovoran i za blaga sedativna i spazmolitska svojstva ove biljke (Masakova i sar., 1979). Antibakterijska aktivnost etarskog ulja vrste *M. officinalis* je takođe detektovana protiv multiplo rezistentnih sojeva. Dobijene MIC vrednosti su iznosile 1,41-4 µL mL⁻¹, a MBC 2-4 µL mL⁻¹, pri čemu je antimikrobni efekat protiv *A. baumannii* izolata najčešće postignu pri koncentraciji etarskog ulja od 2 µL mL⁻¹. Ranije analizirana etarska ulja *M. officinalis* nisu vršena na sojevima ove vrste, ali potvrđena je antimikrobna aktivnost 20 % (20 µL mL⁻¹) ovog ulja protiv vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Samonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi, *Shigella sonnei*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus*

flavus, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* i *Bacillus subtilis* (Mimica-Dukic i sar., 2004), protiv kojih je pri istoj koncentraciji potvrđena i ista aktivnost za etarska ulja vrsta *O. basilicum*, *O. vulgare* i *T. vulgaris* takođe poreklom sa teritorije Srbije (Bozin i sar., 2006). Hemijski sastav etarskog ulja iz Vojvodine korišćenog u studiji Mimica-Dukic i sar. (2004) je sličan hemijskom sastavu ulja iste vrste koje je ovde korišćeno protiv *A. baumannii* izolata. Dominantne komponente *M. officinalis* ulja testiranog protiv *A. baumannii* su geranial (25,1 %), neral (19,4 %), *trans*- β -kariofilen (14,6 %) i kariofilen oksid (10,6 %), a etarsko ulje iz pomenute studije, kao glavne komponente takođe je sadržalo geranial (23,4 %), neral (16,5 %) i citronelal (13,7 %) (Mimica-Dukic i sar., 2004). Na onovu svega navedenog jasno je da etarsko ulje vrste *M. officinalis* poseduje umeren antibakterijski efekat i može se koristiti kao antibakterijski agens u različitim formulacijama.

Od svih etarskih ulja koja se komercijalno koriste, etarska ulja vrste *Lavandula angustifolia* su jedna od najpopularnijih. Najranija terapijska primena ovog ulja datira još iz vremena Rimljana i Grka (Eveleigh, 1994), a značaj ovog etarskog ulja, naročito kao antimikrobnog agensa je istaknuta u velikom broju studija (citirano u preglednom radu Cavanagh i Wilkinson, 2002). U velnes industriji i industriji aromaterapije etarsko ulje lavande se koristi za tretman u slučaju velikog broja različitih bolesti, poput glavobolja, prhlada, kašlja, manjih opekotina, kao i za tretman rana (Lawless, 1995). Ovde je potvrđena antibakterijska aktivnost etarskog ulja *L. angustifolia* protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana. MIC i MBC vrednosti su varirale u opsegu 1-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, dok je prema rezultatima de Rapper i sar. (2013) MIC vrednost etarskog ulja ove vrste iznosila 2 mg mL^{-1} ($\sim 1,8 \mu\text{L mL}^{-1}$) i to protiv kliničkih i referentnih sojeva vrsta meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*, meticilin-gentamicin rezistentni *S. aureus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, vankomicin-rezistentni *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Glavne komponente ovog ulja su linalil acetat (36,7 %), linalol (31,4 %) i terpinen-4-ol (14,9 %) (de Rapper i sar., 2013). Ovde korišćeno ulje pripada hemotipu 2 (linalil acetat), jer kao glavne komponente sadrži linalil acetat (22,3 %), linalol (21,2 %), kamfor (14,3 %) i 1,8-cineol (10,9 %). Rezultati ukazuju na činjenicu da su za detektovan anti-*A. baumannii* efekat ovog ulja najverovatnije odgovorne komponente linalil acetat i linalol, ali i njihove moguće sinergističke interakcije kako međusobno tako i sa ostalim komponentama zastupljenim u manjim količinama. Detektovan antibakterijski efekat etarskog ulja vrste *L. angustifolia* protiv multiplo rezistentnih izolata iz patološkog materijala potvrđuje i opravdava dosadašnju široku primenu ovog etarskog ulja.

Bosiljak i ruzmarin se od davnina koriste za lečenje prehlade, groznice, kašlja, astme, sinuzitisa i reumatizma, ali i za ubrzanje procesa zarastanja rana (Wannissorn i sar., 2005). Etarsko ulje vrste *Ocimum basilicum* je pokazalo antimikrobnu aktivnost protiv svih testiranih *A. baumannii* izolata iz rana, a utvrđene MIC vrednosti su iznosile 0,71-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ i MBC vrednosti 1-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Prema rezultatima de Rapper i sar. (2013), MIC vrednost *O. basilicum* etarskog ulja protiv *P. aeruginosa* ATCC 27858 je 1,5 mg mL^{-1} ($\sim 1,4 \mu\text{L mL}^{-1}$), a

za *S. aureus* ATCC 6538 je 2,7 mg mL⁻¹ (~ 2,4 μL mL⁻¹), pri čemu je glavna komponenta ovog ulja linalol (54,1 %). Ovde ispitivano etarsko ulje vrste *O. basilicum* je takođe kao najdominantniju komponentu sadrži linalol (35,8 %), ali i 1,8-cineol (15,7 %), eugenol (12,8 %) i *trans*-α-bergamoten (7,2 %). Za razliku od ovih rezultata, Sienkiewicz i sar. (2013) su utvrdili da etarsko ulje ove biljke kao glavne komponente sadrži estragol (86,4 %) i 1,8-cineol (4,9 %), a antibakterijski efekat protiv 60 kliničkih *E. coli* izolata je ostvarilo pri koncentracijama 8-11,5 μL mL⁻¹.

Ispitan je i anti-*A.baumannii* efekat etarskog ulja *Rosmarinus officinalis*, koje pripada hemotipu 2 (1,8-cineol), a čije su glavne komponente su 1,8-cineol (44,4 %), kamfor (10,9 %), α-pinen (10,2 %) i β-pinen (8 %). Takođe, prema dobijenim rezultatima MIC i MBC vrednosti za multiplo rezistentne *A. baumannii* sojeve, etarsko ulje *R. officinalis* je posedovalo slabiji antimikrobni efekat u odnosu na ostala ovde ispitivana etarska ulja (2 do >4 μL mL⁻¹). Čak sedam *A. baumannii* izolata nije bilo osetljivo na najveću testiranu koncentraciju etarskog ulja (4 μL mL⁻¹). U gore pomenutoj studiji (de Rapper i sar., 2013) aktivnost etarskog ulja vrste *R. officinalis* protiv *E. coli* izolata je bila slabija u odnosu na ulje *O. basilicum*, jer je njegova antibakterijska aktivnost detektovana pri znatno višim koncentracijama (18-20 μL mL⁻¹), a njegove dominantne komponente bile su veoma slične sa komponentama ulja korišćenim za kontrolu *A. baumannii*: 1,8-cineol (46,4 %), kamfor (11,4 %), α-pinen (11 %), β-pinen (9,2 %). Razlika u efektu *O. basilicum* i *R. officinalis* etarskih ulja koju su detektovali ovi autori, može se primetiti i kod ulja koja su korišćena protiv *A. baumannii*. Rezultati de Rapper i sar. (2013) su dokazali antimikrobnu aktivnost *R. officinalis* etarskog ulja, ali protiv vrsta *P. aeruginosa* ATCC 27858 (MIC 2 mg mL⁻¹; ~ 1,8 μL mL⁻¹) i *S. aureus* ATCC 6538 (MIC 4 mg mL⁻¹; ~ 3,6 μL mL⁻¹), a kao dominantna komponenta ovog ulja detektovan je takođe 1,8-cineol (48 %). Na osnovu ovoga se može zaključiti da je za antimikrobnu aktivnost detektovanu kod etarskih ulja *R. officinalis* hemotip 2 odgovorna komponenta 1,8-cineol. Ipak, detektovana slabija antibakterijska aktivnost u poređenju sa etarskim uljima drugih ovde testiranih biljnih vrsta, sugerise da ostale bioaktivne komponente prisutne u ovom ulju utiču na aktivnost komponente 1,8-cineol, kao i na celokupan efekat ulja. Moguće je da 1,8-cineol i neke od slabije zastupljenih komponenti ulja ispoljavaju antagonističko delovanje, zbog čega je testirano ulje *R. officinalis* ostvarilo nisku antibakterijsku aktivnost. Imajući u vidu da ovim uljem nije postignuta inhibicija svih sojeva u ispitivanim koncentracijama i pošto sadrži relativno visok procenat kamfora, ne preporučuje se kao anti-*A. baumannii* agens.

Osobina vrste *Foeniculum vulgare* da miriše na anis je posledica etarskog ulja ove vrste, koja ga čini odličnom aromom kada se korisiti u pečenoj hrani, jelima od mesa i ribe, sladoledima i alkoholnim pićima (Rather i sar., 2012). Dobijeni rezultati u ovoj studiji potvrđuju antibakterijsku aktivnost etarskog ulja vrste *F. vulgare* protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva, a ranije je detektovana i aktivnost protiv velikog broja drugih Gram

pozitivnih (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *B. cereus*, *B. brevis*, *S. aureus*) i Gram negativnih bakterijskih vrsta (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella Typhimurium*) (Mohsenzadeh, 2007; Ozcan i sar., 2006; Ruberto i sar., 2000). Antibakterijski efekat etarskog ulja *F. vulgare* protiv genomske vrste *A. baumannii* ovde je najčešće detektovan pri koncentraciji $4 \mu\text{L mL}^{-1}$, što predstavlja sličnu aktivnost, ali slabiju u odnosu na ostala ispitivana etarska ulja. MIC vrednosti etarskog ulja *F. vulgare* su se kretale u opsegu od 2 do $4 \mu\text{L mL}^{-1}$, a MBC od 2,83 do $4 \mu\text{L mL}^{-1}$. Jazani i sar. (2009) su u svojim studijama efekta prirodnih antimikrobnih agenasa protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana detektovali i antibakterijsku aktivnost etarskih ulja vrste *Foeniculum vulgare*. Ulje koje su koristili ovi autori je ostvarilo efekat pri MIC 0,03-25 % ($0,03\text{-}25 \mu\text{L mL}^{-1}$) gde je većina sojeva (čak 39 od 48, odnosno 81,3 % ispitivanih izolata) bila osetljiva na sve testirane koncentracije. Drugi autori su takođe zabeležili antibakterijsku aktivnost etarskog ulja ove biljne vrste protiv *A. baumannii* NCTC 7844 pri koncentraciji 1 % (v/v) ($1 \mu\text{L mL}^{-1}$) (Hammer i sar., 1999), što je u saglasnosti sa ovde dobijenim rezultatima umerene antibakterijske aktivnosti protiv multiplo rezistentnih izolata. Neke hemijske komponente etarskih ulja *F. vulgare* su identifikovane kao aktivne antimikrobne komponente, kao što je na primer derivat fenilpropanoida – dilapional, za koji je dokazano da je aktivna antimikrobna komponenta stabla *F. vulgare*. Još jedan molekul – skopoletin, koji je derivat kumarina, izolovan je iz *F. vulgare* i utvrđeno je da poseduje marginalni antimikrobni efekat (Kwon i sar., 2002). Međutim, kao glavne komponente ovde testiranog ulja vrste *F. vulgare* detektovani su E-anetol (80,1 %), fenchone (7,8 %) i etsragol (5,2 %), koji su najverovatnije odgovorni za najveći deo detektovane umerene antimikrobne aktivnosti ovog etarskog ulja. U skladu sa ovom pretpostavkom je i detektovana antimikrobna aktivnost komponente anetol, a MIC vrednost protiv bakterijskih vrsta *Brevibacterium ammoniagenes*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella Choleraesuis*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* se kretala od 100 do $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok je MIC vrednost za *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* i *Pseudomonas aeruginosa* iznosila $>1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Kubo i sar., 2008). Dobijeni rezultati zajedno sa rezultatima dostupnim u literaturi ukazuju da etarsko ulje *F. vulgare* poseduje umerenu aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva najverovatnije kao posledica slabe antimikrobne aktivnosti dominantne komponente anetol.

Peršun (*Petroselinum crispum*) je poznat po svom antidijabetskom, antimikrobnom, antihipertenzivnom, antikoagulantnom, antihepatotoksičnom i antioksidativnom efektu (Fejes i sar., 2000). Etarsko ulje vrste *P. crispum* iz porodice Apiaceae, kao i vrsta *Foeniculum vulgare*, je pokazalo lošiju antibakterijsku aktivnost protiv kliničkih *A. baumannii* izolata u odnosu na većinu drugih ispitivanih ulja u ovom radu. Čak 13 izolata ispoljilo je otpornost na tretman ovim uljem pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji ($4 \mu\text{L mL}^{-1}$). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Osman i sar. (2009) koji su ustanovili da etarsko ulje ove vrste poreklom iz Egipta takođe ne poseduje antimikrobnu aktivnost protiv

bakterijskih vrsta *Proteus vulgaris* i *Escherichia coli*, dok su protiv *Salmonella enterica* utvrdili antibakterijsku aktivnost (MIC vrednost je 500 ppm, tj. 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Detektovana slabija antibakterijska aktivnost etarskog ulja *P. crispum* u odnosu na ostala ulja protiv *A. baumannii* je verovatno posledica njegovog hemijskog sastava. Etarsko ulje koje su testirali Omsan i sar. (2009) je kao glavne komponente sadržalo miristicin (24,10 %), apiol (16,7 %) i α -terpineol (10,5 %), dok je ovde korišćečno ulje kao dominantne komponente sadržalo 1,3,8-p-mentatrien (19,9 %), miristicin (16,8 %), α -pinen (14 %), β -pinen (10,1 %), 1,8-cineol (9,2 %) i elemicin (5,2 %). Ove razlike u anti-*A. baumannii* aktivnosti između ulja korišćenih u ovom radu i onih od strane Osman i sar. (2009) rezultat su očiglednih razlika u sastavu ulja. Na osnovu utvrđene antibakterijske aktivnosti jasno je da etarsko ulje vrste *P. crispum* ne predstavlja adekvatan izbor kada je u pitanju tretman multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva.

Poznato je da su još rane kulture prepoznale vrednost upotrebe začina i biljaka za konzervisanje hrane, kao i u medicinske svrhe (Jones, 1996). Začinska biljka *Coriandrum sativum* se nalazi među biljkama poznatim po svojoj sposobnosti produkcije etarskih ulja sa antimikrobnom aktivnošću (Burt, 2004). Antibakterijski efekat etarskog ulja *C. sativum* protiv multiplo rezistentnih izolata je zabeležen pri MIC i MBC vrednostima u koncentracijama 2-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, pri čemu je 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ etarskog ulja bila efikasna protiv najvećeg broja izolata. Dominantne komponente ovde korišćenog etarskog ulja su linalol (73,6 %), kamfor (3,7 %), E-anetol (3,7 %) i geraniol (3,2 %). Bitno je istaći da je *C. sativum* etarsko ulje pokazalo bolji efekat protiv *A. baumannii* izolata u odnosu na ovde testirana etarska ulja druge dve vrste iz porodice Apiaceae (*Foeniculum vulgare* i *Petroselinum crispum*), najverovatnije zato što je kao dominantnu bioaktivnu komponentu posedovalo linalol, za koju je već poznato da poseduje antimikrobnu aktivnost. Međutim, zanimljivo je napomenuti da je za etarsko ulje *C. sativum* takođe poreklom iz Srbije koje je je kao dominantnu komponentu sadržalo linalol (74,6 %) pokazano je da poseduje jaku prooksidativnu aktivnost (Samojlik i sar., 2010). U studiji Bankar i sar. (2011) etarsko ulje *C. sativum* je kao dominantne komponente sadržalo linalol (83,2 %), geranil acetat (5,7 %) i α -pinen (4,5 %), i ostvarilo slabu antimikrobnu aktivnost na Gram pozitivne bakterije i kvasce (MIC 5-10 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Ovakvi rezultati ukazuju da je osim dominantne komponente linalol, značajna uloga i ostalih manje zastupljenih komponenti za ostvarivanje umerenog antimikrobnih efekta protiv Gram negativnih multiplo rezistentnih izolata genomske vrste *A. baumannii*.

Analiza antimikrobne aktivnosti etarskih ulja biljaka iz porodice Asteraceae obuhvatila je etarska ulja dve vrste, *Achillea millefolium* i *Artemisia dracuncululus*. Prema dobijenim rezultatima, etarsko ulje vrste *A. dracuncululus* je posedovalo antibakterijsku aktivnost (bakteriostatsku i baktericidnu) protiv *A. baumannii* izolata pri koncentracijama od 2 do 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Ranije studije su takođe detektovale antibakterijsku aktivnost etarskih ulja ove vrste

protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana mikrodilucionom metodom (MIC $1,56 \times 10^{-2}$ do $3,9 \times 10^{-3}$ mm³mm⁻³; $0,156$ - $3,9$ $\mu\text{L mL}^{-1}$) (Jazani i sar., 2011), ali i drugih Gram negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Alcaligenes faecalis*, *Providencia rettgeri*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*) gde su MIC vrednosti su iznosile $3,8$ - $31,2$ mg mL⁻¹ ($\sim 3,5$ - $28,1$ $\mu\text{L mL}^{-1}$), a MBC vrednosti $7,8$ - $62,4$ mg mL⁻¹ (~ 7 - $56,2$ $\mu\text{L mL}^{-1}$) (Chaleshtori i sar., 2013; Bonyadian i Karim, 2002). Prema rezultatima de Rapper i sar. (2013) MIC vrednosti *A. dracunculus* etarskog ulja protiv sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27858 i *S. aureus* ATCC 6538 su iznosile 2 mg mL⁻¹, odnosno 3 mg mL⁻¹ ($\sim 1,8$ i $2,7$ $\mu\text{L mL}^{-1}$), redom, a kao glavna komponenta detektovan je estragol u visokom procentu (82,6 %). Dokazano je da etarsko ulje *A. dracunculus* sa visokim sadržajem (Z)-anetola (81 %) ne ispoljava antibakterijski efekat (Kordali i sar., 2005), dok etarsko ulje sa visokim sadržajem estragola (84 %) poseduje ovaj efekat (Chaleshtori i sar., 2013). Ovde korišćeno etarsko ulje vrste *A. dracunculus* kao dominantne komponente posedovalo je metil eugenol (72,3 %) i sabinen (12,4 %), koje su odgovorne za najveći deo detektovane anti-*A. baumannii* aktivnosti ovog ulja, koja u poređenju sa ostalim uljima može biti okarakterisana takođe kao umerena aktivnost.

Achillea millefolium je sa etno-farmakološkog stanovišta dobro poznata vrsta. Majčina dušica je poznata kao tradicionalni lek za tretman gastro-intestinalnih poremećaja i hepatobilijarnih problema, kao i za zarastanje rana i lečenje upala kože (Ugulu i sar., 2009). Među tradicionalnim turskim lekovima ova biljka se koristi kao predjelo, za lečenje rana, kao diuretik, regulator nadimanja ili menstruacije (Chandler i sar., 1982). Antimikrobni efekat etarskog ulja vrste *A. millefolium* je potvrđen u ovom radu i za izolate genomske vrste *A. baumannii* i to kada je ulje primenjeno u koncentraciji 1 - 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, što je oko 2 i više puta niža koncentracija u poređenju sa etarskim uljem vrste *Artemisia dracunculus* iz iste porodice biljaka. Prema rezultatima drugih autora etarsko ulje ove vrste poreklom iz Turske je posedovalo antibakterijsku aktivnost pri koncentracijama $4,5$ - 72 mg mL⁻¹ ($\sim 4,1$ - $64,8$ $\mu\text{L mL}^{-1}$) protiv bakterijskih vrsta *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium smegmatis*, dok protiv vrsta *Moraxella catarrhalis*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* i *P. aeruginosa* ovo ulje nije posedovalo antimikrobnu aktivnost (Candan i sar., 2003). Prema rezultatima nekih autora komponente kamfor i $1,8$ -cineol su uglavnom odgovorne za antimikrobnu aktivnost biljnih ulja koja ih sadrže (Jalsenjak i sar., 1987, Sivropoulou i sar., 1995), što je potvrđeno i za etarska ulja biljaka *A. millefolium* poreklom sa prostora Republike Srbije (planine Golije i Radan) (Bozin i sar., 2008). Međutim, etarsko ulje *A. dracunculus* iz Turske je u većem procentu sadržalo $1,8$ -cineol (24,6 %), kamfor (16,7 %) i α -terpineol (10,2 %), dok je prema svom hemijskom sastavu ovde korišćeno ulje protiv *A. baumannii* kao dominantne komponente sadržalo sabinen (16,3 %), germakren D (14,7 %), *trans*- β -kariofilen (14,5 %), β -pinen (10,3 %) i artemisia keton (5,6 %). Za razliku od etarskog ulja iz Turske koje je ispoljilo bolju aktivnost, ovde korišćeno etarsko ulje *A.*

dracunculus ne poseduje komponentu kamfor, tako da je njegova primena kao anti-*A. baumannii* moguća, naročito kao dezinficijensa u bolničkoj sredini. Takođe, detektovan bakteriostatski efekat ovog ulja na izolate iz rana je u saglasnosti sa njegovom tradicionalnom apikalnom primenom na koži. Za potencijalnu *in vivo* primenu su svakako neophodna detaljnija ispitivanja, kao što je slučaj i sa ostaljim uljima koja su ispoljila značajnu antibakterijsku aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata.

Prema detektovanoj anti-*A. baumannii* aktivnosti etarska ulja testirana u ovom radu se mogu hijerarhijski poređati od najaktivnijeg ka najmanje aktivnom, prema kriterijumu izračunate geometrijske sredine utvrđenih MIC vrednosti za *A. baumannii* izolate iz rana: *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (karvakrol 71,1 %) > *E. camaldulensis* (EuB) (spatulenol 21,4 %) > *Thymus vulgaris* > *E. camaldulensis* (EuHN) (spatulenol 18,8 %) > *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* (kariofilen oksid 15,6 %) > *Salvia officinalis* (α -tujon 23,9 %) > *Juniperus foetidissima* (iglice) (sabinen 39,9 %) > *Myrtus communis* (MyB) (linalol 26,6 %) > *Ocimum basilicum* (linalol 35,8 %) > *Lavandula angustifolia* (linalil acetat 22,3 %) > *Achillea millefolium* (sabinen 16,3 %) > *Melissa officinalis* (geranial 25,1 %) > *Thymus serpyllum* (timol 37,1 %) > *Satureja hortensis* (karvakrol 46,7 %) > *Coriandrum sativum* (linalol 73,6 %) > *Myrtus communis* (MyHN) (linalol 18,3 %) > *Myrtus communis* (MyK) (linalol 22,3 %) > *Origanum majorana* (terpinen-4-ol 23,3 %) > *Mentha x piperita* (menton 41,1 %) > *Rosmarinus officinalis* (1,8-cineol 44,4 %) > *Foeniculum vulgare* (E-anetol 80,1 %) > *Artemisia dracunculus* (metil eugenol 72,3 %) > *Hyssopus officinalis* (*cis*-pinokamfon 50,7 %) > *Petroselinum crispum* (1,3,8-mentatrien 19,9 %) > *Juniperus communis* (Fruška gora, iglice) > *Juniperus macrocarpa* (iglice) (α -pinen 49,4 %) > *Juniperus sabina* (iglice) (sabinen 54,3 %) > *Juniperus sibirica* (iglice) (α -pinen 74,5 %) > *Juniperus phoenicea* (iglice) (α -pinen 43,6 %) > *Juniperus communis* (Fruška gora, šišarke) > *Juniperus phoenicea* (šišarke) (α -pinen 60,9 %) > preostala etarska ulja biljaka roda *Juniperus* koja nisu ostvarila antibakterijski efekat ni na jedan od testiranih izolata (*Juniperus sibirica*, šišarke (α -pinen 50,1 %); *Juniperus oxycedrus* iglice (α -pinen 20,4 %) i šišarke (α -pinen 75,6 %); *Juniperus communis* BiH, iglice i šišarke; *Juniperus macrocarpa*, šišarke (α -pinen 47,8 %); *Juniperus excelsa*, iglice (α -pinen 30,9 %) i šišarke (α -pinen 76,7 %)). Na osnovu utvrđene antibakterijske aktivnosti, ovde korišćena etarska ulja su grupisana u četiri kategorije - etarska ulja slabe, umerene, izražene i veoma izražene anti-*A. baumannii* aktivnosti. U prvu kategoriju se izdvojilo etarsko ulje vrste *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, koje se statistički značajno razlikovalo prema ostvarenoj bakteriostatskoj aktivnosti i kao takvo okarakterisano je kao najefikasnije protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana. Etarska ulja sa najslabijom ili čak odsustvom anti-*A. baumannii* aktivnosti pri najvišim testiranim koncentracijama izdvojila su se ulja roda *Juniperus*, sva osim *J. foetidissima* koje je svrstano u kategoriju etarskih ulja sa izraženom aktivnošću, koje je za razliku od ostalih ulja ovog roda sadržalo sabinen kao dominantnu komponentu. Takođe, izražen do umeren anti-*A. baumannii* efekat ostvarila etarska ulja biljaka iz porodica Lamiaceae i Myrtaceae, a etarska

ulja biljaka iz porodica Apiaceae i Asteraceae uglavnom su ispoljila umerenu do slabu antibakterijsku aktivnost. Osim toga, utvrđena je statistički značajna razlika između MIC i MBC vrednosti za etarska ulja 15 biljnih vrsta, odnosno kod 62,5 % etarskih ulja koja su ispoljila anti-*A. baumannii* efekat. Razlika je utvrđena za sva etarska ulja biljaka porodice Myrtaceae, 8 ulja biljaka iz porodice Lamiaceae, i po jedno ulje iz porodica Apiaceae i Asteraceae. Većinu testiranih ulja potrebno je primenjivati u višim koncentracijama u cilju potpune eradikacije multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana, zbog čega je potrebno testirati i neke druge pristupe poput kombinovanog efekta antimikrobnih agenasa.

Osetljivost multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana na etarska ulja kao nekonvencionalne antimikrobne agense je svakako zavisi i od karakteristika samog soja, tj. posledica je određenih fenotipskih i genotipskih osobina. Prema dobijenim rezultatima za biljke iz porodice Myrtaceae, statistički značajna negativna linearna korelacija utvrđena između osetljivosti izolata na etarska ulja vrste *E. camaldulensis* i stepena njihove hidrofobnosti, ukazuje da su hidrofobniji sojevi bili osetljiviji na efekat ovih etarskih ulja. Naime, etarska ulja kao hidrofobna jedinjenja lakše ostvaruju uticaj na površinske strukture hidrofobne bakterijske ćelije, pa tako ostvaruju i antibakterijski efekat pri nižim koncentracijama. Ipak, jasna korelacija između hidrofobnosti ćelije i efekta etarskih ulja nije utvrđena za ulja ostalih biljaka, što je verovatno rezultat uticaja i niza drugih faktora na antimikrobni efekat. Tako je negativna korelacija, utvrđena između osobine autoagregacije i osetljivosti sojeva na etarsko ulje *M. communis* (MyK), što ukazuje da su ćelije koje u većoj meri formiraju autoagregate osetljivije na ovo etarsko ulje, ali ovaj fenomen nije detektovan za preostala ulja, čak ni za ostala dva ulja ove iste biljne vrste. Viši stepen autoagregativnosti kod sojeva osetljivijih na MyK može se objasniti činjenicom da etarsko ulje deluje samo na površinske ćelije u okviru agregata, dok ćelije u dubljim slojevima ostaju netaknute, tako da ni TTC koji je korišćen kao pokazatelj metaboličke aktivnosti bakterija nakon tretmana ne dopre do njih, što dovodi do izostanka formiranja crvenog formazana i posledično do karakterizacije ćelija kao osetljivijih na efekat ovog etarskog ulja.

Osetljivost sojeva iz rana na etarska ulja vrsta *Hyssopus officinalis* i *Mentha x piperita* iz porodice Lamiaceae je u pozitivnoj korelaciji sa osobinom produkcije lektina, odnosno sojevi sa više lektina su ispoljili veći stepen rezistencije na pomenuta etarska ulja. Može se pretpostaviti da prisustvo lektina na površini ćelije ometa efekat etarskih ulja stupajući u međusobnu interakciju i/ili smanjujući dostupnost njenih membrana etarskim uljima, što za rezultat ima smanjenu osetljivost sojeva.

Sposobnost produkcije biofilma je bila u direktnoj linearnoj korelaciji sa osetljivošću sojeva na etarska ulja biljnih vrsta *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis* i *Achillea millefolium*, što potvrđuje ulogu bakterijskog biofilma u zaštiti ćelije ne samo na konvencionalne već i na prirodne antimikrobne agense. Iako nisu utvrđene statistički značajne linearne korelacije između svih ispitivanih osobina *A. baumannii* i njihove osetljivosti na različite nekonvencionalne antimikrobne agense, ovde utvrđene i navedene

korelacije ukazuju da veliki broj osobina bakterijske ćelije može u različitoj meri uticati na krajnji ukupni efekat etarskog ulja kao antimikrobnog agensa. Zbog toga nije moguće izvesti validne zaključke o fenotipskim i genotipskim osobinama bakterija koje su odgovorne za osetljivost na etarska ulja.

Etarska ulja, kao kompleksne mešavine hemijskih jedinjenja, osim antibakterijskih efekata, mogu ostvariti i neželjene, potencijalno štetne efekte. Prema klasifikaciji koja je opšte prihvaćena među toksikolozima (Niesink i sar., 1996), više od 200 etarskih ulja koja su testirana u smislu akutne oralne toksičnosti, pri čemu ni jedno od ispitivanih etarskih ulja nije pripadalo kategoriji “ekstremno toksičnih ulja”, kao ni kategoriji “veoma toksičnih ulja”, dok su najtoksičnija etarska ulja pripadala kategoriji “umereno toksičnih etarskih ulja”. Iz tog razloga etarska ulja nekih biljaka smatraju se bezbednim za korišćenje čak i kod trudnica (*Coriandrum sativum* i *Lavandula angustifolia* od ovde testiranih ulja), neka su adekvatna samo za površinsku primenu (*Foeniculum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* i *Achillea millefolium*), dok se upotreba pojedinih etarskih ulja ne preporučuje (*Hyssopus officinalis*, *Petroselinum crispum* i *Juniperus sabina*) (Braun i Choen, 2010). Tako na primer, etarsko ulje *Salvia officinalis* koje je ovde ispoljilo antibakterijsku aktivnost protiv *A. baumannii* izolata, sadrži tujon i kamfor kao dominantne komponente, zbog čega treba voditi računa prilikom njegove primene, jer je dokazano je da je komponenta tujon potencijano toksična i kancerogena za pacove i miševе u količini 25 i 50 mg kg⁻¹ (National Toxicology Program, 2011), a komponenta kamfor potencijalno neurotoksična (Council of Europe, 2008). Međutim, predložen dnevni limit doze iznosi 3,5 mg i 6,6 mg i okarakterisan je kao “nezabrinjavajući”, ali takođe je preporučeno da količina tujona u preparatima mora biti naznačena (HMPC, 2011). Najverovatnija humana letalna doza komponente kamfor iznosi 50 mg kg⁻¹, a dermalna toksičnost ove komponente utvrđena na zecu iznosi >5 g kg⁻¹ (Opdyke, 1978). Iz tog razloga, sprovedena su istraživanja toksičnosti etarskih ulja na životinjama i za pojedina etarska ulja postoje preporučeni limiti oralnih i dermalnih doza, pri čemu su preporučene doze za većinu ulja kretale u opsegu 1-4 %, dok je za *Eucalyptus* sp. limit doze 10 % (Lis-Balchin, 2006), mada za etarska ulja *E. camaldulensis* nije određen njihov kompletan profil toksičnosti. Etarska ulja *Myrtus communis* su još slabije proučena i njihov profil toksičnosti je takođe nepotpun. Za etarska ulja *Myrtus communis*, pripremljena od istih biljaka kao i ovde testirana ulja je utvrđeno da poseduju umerenu antioksidativnu aktivnost sa IC₅₀ vrednostima 6,2 mg mL⁻¹ i 6 mg mL⁻¹ (Mimica-Dukić i sar., 2010). U istoj studiji su utvrđene i antimutagene osobine ovih ulja za spontanu i indukovanu mutagenezu kod *E. coli*, gde je smanjenje spontane mutageneze iznosilo 13 %, a indukovane 28 %, pri čemu su rezultati dobijeni za indukovanu mutagenezu bili u korelaciji sa ostvarenom antioksidativnom aktivnošću. Biljka *M. communis* može predstavljati obećavajući izvor prirodnih antioksidanasa, anti-genotoksičnih, anti-mutagenih i možda čak hemopreventivnih agenasa (Mimica-Dukić i sar., 2010), dok *E. camaldulensis* poseduje osim antibakterijskog, još i antioksidativni i antimutageni efekat (Grbović, 2010). Za etarska ulja eukaliptusa

utvrđena bezbedna dnevna doza za oralnu primenu kod odraslih iznosi 300-600 mg, dok maksimalna doza za površinsku primenu na koži iznosi 5-20 % (Blumenthal i sar., 1998; Tisserand i sar., 2014). Ovi rezultati ukazuju da obe biljne vrste poseduju potencijalni značaj za izučavanje i novih prirodnih produkata u kontroli kancera, a ne samo bioaktivnih komponenti sa antimikrobnom aktivnošću. Pri tome, MIC vrednosti su ispod detektovanih vrednosti toksičnosti, što potvrđuje bezbednost upotrebe ovih ulja.

Dobijeni podaci su ohrabrujući i idu u korist potencijalnoj primeni etarskih ulja kao alternativnih antimikrobnih agenasa. Poseban akcenat treba staviti na *M. communis* i *E. camaldulensis*, jer su ispoljila sličan ili bolji antibakterijski efekat u odnosu na ulja biljnih vrsta čija je aktivnost mnogo detaljnije ispitana prema podacima dostupnim u literaturi. Ispitivanje šireg spektra etarskih ulja različitih biljnih vrsta može povećati verovatnoću pronalazjenja nekih novih bioaktivnih agenasa sa još značajnijom aktivnošću od do sada testiranih. Tako na primer, etarsko ulje *E. globulus* je mogo bolje ispitano u odnosu na ulje vrste *E. camaldulensis*, koje je ovde ispoljilo značajan efekat na testirane izolate. Zanimljivo je da ovo ulje nije posedovalo kao dominantnu komponentu dobro poznat 1,8-cineol, već spatulenol i kripton, čija aktivnost i mehanizam delovanja još uvek nisu dovoljno poznati. Takođe, prema podacima objavljenim u literaturi kao i svim ovde dobijenim rezultatima antimikrobne aktivnosti različitih etarskih ulja protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva, etarska ulja osim brojnih bioloških aktivnosti, poseduju i izražen anti-*A. baumannii* efekat. Na osnovu toga jasno je da etarska ulja poseduju terapijski potencijal u slučaju različitih infekcija izazvanih ovom bakterijskom vrstom, posebno kada su u pitanju infekcije rana, pošto su aktivne koncentracije većine ulja ostvarive prilikom njihove lokalne primene. Zbog svega navedenog, etarska ulja predstavljaju efikasno potencijalno rešenje u borbi protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata, ali i neiscrpan izvor molekula sa višestrukim ulogama, zbog čega bi ovim prirodnim produktima u budućnosti trebalo dati prednost u odnosu na sintetske hemijske agense.

6.4.2. OSETLJIVOST *A. baumannii* IZOLATA NA BILJNE EKSTRAKTE

Imajući u vidu da je genovrsta *A. baumannii* rezistentna na veliki broj konvencionalnih antimikrobnih agenasa koji pripadaju različitim grupama, ispitivana je i mogućnost primene biljnih ekstrakata za kontrolu *A. baumannii* izolovanih iz rana.

Ispitan je antibakterijski efekat četrnaest ekstrakata devet različitih biljnih vrsta. Od svih ispitivanih ekstrakata, šest je ispoljilo anti-*A. baumannii* efekat: etanolni ekstrakti biljaka roda *Rumex*, i to obe ispitivane biljne vrste, *R. sanguineus* i *R. crispus* (herbe - H i rizoma - R), sa lokaliteta Zmajevac (NZ) i Iriški venac (Z) na Fruškoj gori. Ekstrakt *R. sanguineus* 4NZ_H_p je delovao inhibitorno i baktericidno na sve ispitivane izolate iz rana sa najnižim MIC i MBC vrednostima u odnosu na ostale biljne ekstrakte. MIC vrednosti su iznosile 1 mg mL⁻¹, osim za 4 izolata iz rana (Aba-2572, Aba-2793, Aba-4727 i Aba-8781), gde je utvrđena

MIC vrednost iznosila 2 mg mL⁻¹. Sličan efekat je ispoljio i etanolni ekstrakt *R. crispus* 171 gde je MIC vrednost za izolate Aba-4890, Aba-5055, Aba-8255 i Aba-3496 bila 2 mg mL⁻¹, dok su za sve ostale izolate iz rana MIC vrednosti iznosile 1 mg mL⁻¹. Ostala tri ekstrakata *R. sanguineus* (4NZ_R, 4Z_H i 4Z_R) ispoljila su takođe značajan bakteriostatski i baktericidni efekat. Vrednosti minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije kretale su se od 1 do 2 mg mL⁻¹ za većinu ispitivanih bakterijskih izolata, dok je manji broj izolata bio osetljiv pri višim koncentracijama ekstrakata od 4 do 8 mg mL⁻¹. Yildirim i sar. (2001) su takođe dokazali da etarski i etanolni ekstrakti listova i semena biljke *R. crispus* poseduju antibakterijsku aktivnost, dok vodeni ekstrakti ne poseduju ovakvu aktivnost. Međutim, oni su dokazali antibakterijsku aktivnost disk difuzionom metodom samo protiv sojeva bakterijskih vrsta *S. aureus* i *B. subtilis* sa prečnikom zone inhibicije 0,8-1,1 cm, dok su sojevi *P. aeruginosa*, *E. coli* i *C. albicans* bili rezistentni na pomenute ekstrakte. Za razliku od njihovih rezultata, ovde je detektovana antibakterijska aktivnost ekstrakata iste biljne vrste *R. crispus*, ali protiv Gram negativnih multiplo rezistentnih izolata mikrodilucionom metodom. Osim toga, dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da je antibakterijska aktivnost DMSO i etanolnih ekstrakata herbe i rizoma bolja od aktivnosti etarskih i vodenih ekstrakata koje su testirali Yildirim i sar. (2001), imajući u vidu činjenicu da su njihovi ekstrakti ispoljili antibakterijski efekat samo protiv Gram pozitivnih bakterija. Za razliku od ove studije, ovde je testirana aktivnost ekstrakata vrste *R. sanguineus* protiv Gram negativnih multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata po prvi put i dokazan je značajan bakteriostatski i baktericidni efekat ovih ekstrakata. Kada posmatramo efekat *R. sanguineus* ekstrakata herbe i rizoma, može se uočiti da su ekstrakti herbe ispoljili bolji antibakterijski efekat, sa nižim MIC i MBC vrednostima u odnosu na ekstrakte rizoma. Ovde je bitno istaći da je katehin dominantna komponenta ekstrakata biljaka roda *Rumex*, kao i da je njegoza zastupljenost bila značajno veća u ekstraktima herbi (12,3-42 mg po g suvog ekstrakta) u odnosu na ekstrakte rizoma (3,5-13,3 mg po g suvog ekstrakta), što ukazuje da je upravo ova komponenta u najvećoj meri odgovorna za detektovanu antibakterijsku aktivnost. Zanimljivo je primetiti da su ekstrakti ovih biljaka pokazali veoma dobru anti-*A. baumannii* aktivnost, koja se može uporediti sa aktivnošću etarskih ulja, ali i to da je utvrđena statistički značajna negativna linearna korelacija između MIC vrednosti *A. baumannii* izolata iz rana za ekstrakt rizoma *R. sanguineus* (4Z_R) i osobine sposobnosti produkcije biofilma ovih izolata ($\tau = -0,41$, $P = 0,016$). Ovakvi rezultati ukazuju ne samo na razlike u mehanizmu aktivnosti etarskih ulja i biljnih ekstrakata, već i na činjenicu da ovi ekstrakti potencijalno pokazuju aktivnost na fenotip biofilma. Zbog toga bi u budućim studijama ovom ekstraktu trebalo posvetiti više pažnje, a posebno na interakciju komponenti ekstrakata sa matriksom biofilma.

Poznato je da *U. dioica* predstavlja bogat izvor bioaktivnih fitohemijskih komponenti, kao što su fenolna jedinjenja, koja se mogu koristiti kao potencijalni izvor korisnih lekova (Ahmed i sar., 2012). Utvrđeno je da su terpeni i fenolna jedinjenja u ekstraktima *U. dioica* jedna od glavnih i najvećih grupa koje inhibiraju mikroorganizme (Dar i sar, 2012). Međutim,

za razliku od ekstrakata roda *Rumex*, metanolni ekstrakti vrste *Urtica dioica* (9-H i 10-H), nisu ispoljili značajno antibakterijsko dejstvo protiv bakterijskih sojeva *A. baumannii* u ispitivanom opsegu koncentracija, jer su MIC i MBC vrednosti za sve ispitivane izolate bile veće od 8 mg mL⁻¹. Gülçin i sar. (2004) su ispitivali ekstrakte iste biljne vrste protiv Gram negativnih (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Escherichia coli* ATCC 9837, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*) i Gram pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*), kao i protiv *Candida albicans* (ATCC 10231). Oni su pokazali disk difuzionom metodom da ekstrakti *U. dioica* poseduju antibakterijsku aktivnost, gde je pri koncentraciji ekstrakta od 250 µg prečnik zone inhibicije iznosio od 8 do 13 mm, osim za vrstu *P. aeruginosa* za koju nije detektovana aktivnost pri ovoj koncentraciji. Antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata iste biljne vrste nije dokazana ni protiv multiplo rezistentnih izolata Gram negativne vrste *A. baumannii* koji su ovde testirani, dok je samo kod referentnog soja *S. aureus* ATCC 25923 detektovana bakteriostatska aktivnost *U. dioica* ekstrakata pri koncentraciji 8 mg mL⁻¹. Utvrđeno je da je za veću rezistenciju Gram negativnih bakterijskih vrsta odgovorno prisustvo spoljašnje membrane u njihovom ćelijskom zidu, koja deluje kao barijera za mnoge supstance, uključujući i bioaktivne komponente biljnih ekstrakata. Prema hemijskom sastavu ovde korišćenih ekstrakata *U. dioica* dominantne komponente su 5-O-kafeoilhinska kiselina (5,7-14,7 mg po g suvog ekstrakta) i rutin (1,4-7,3 mg po g suvog ekstrakta), za koje se može pretpostaviti da ne poseduju anti-*A. baumannii* aktivnost ili nisu bile prisutne u dovoljnoj količini u testirnim ekstraktima. Prema podacima dostupnim u literaturi, 5-O-kafeoilhinska kiselina ispoljava antimikrobnu aktivnost pri MIC vrednostima 5-10 mg mL⁻¹ protiv vrsta *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Candida albicans* (Bajko i sar., 2016) dok rutin istu aktivnost ispoljava pri MIC 4-64 mg mL⁻¹ protiv *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 10145, *P. mirabilis* ATCC 7002, *K. pneumoniae* RSKK 574, *A. baumannii* RSKK 02026, *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *B. subtilis* ATCC 6633 (Orhana i sar., 2010). Ovi podaci o slaboj bakteriostatskoj aktivnosti komponenti 5-O-kafeoilhinska kiselina i rutin su u saglasnosti sa odsustvom anti-*A. baumannii* aktivnosti ekstrakata *U. dioica* u kojima su ove dve komponente bile dominantno zastupljene. Prema rezultatima Ghaima i sar. (2013) etil acetatni ekstrakti vrste *U. dioica* su primenom disk-difuzione metode takođe ispoljili antibakterijsku aktivnost protiv bakterijskih vrsta *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* Typhi, *E. coli*, *S. aureus* i *Bacillus cereus*, gde je pri koncentraciji od 10 mg mL⁻¹ prečnik zone inhibicije iznosio 10-24 mm. Neki autori su dokazali da etilacetatni, heksanski i hlороformski ekstrakti pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost od ostalih ekstrakata (Chahardehi i sar., 2012, Dar i sar., 2012), što ukazuje da bi druge metode ekstrakcije mogle dati ekstrakte sa boljim rezultatima i protiv *A. baumannii* izolata.

Antimikrobni efekat biljaka roda *Allium* potiče od komponente alicin, koja se nalazi u njihovim ekstraktima (Cellini i sar., 1996; Lemar i sar., 2005). Utvrđeno da komponente ekstrakata lukova uključujući i biflavonoide, kao što su kvercetin i cijanidin, imaju značajnu ulogu u sprečavanju bolesti i infekcija, a aktivne supstance kao što su alistin I i alistin II u belom luku su moćni agensi protiv *Staphylococcus* sp. i *E. coli* (Ahsan i Islam, 1996; Hanafy i sar., 1994). Međutim, prema ovde dobijenim rezultatima za *A. baumannii* ni jedan od šest ispitivanih ekstrakata roda *Allium* (*A. melanantherum*, *A. fuscum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. rhodopeum*, *A. cepa* i *A. sativum*), nije ispoljio aktivnost u ispitivanom opsegu koncentracija. Dominantna komponenta ekstrakata vsta *A. melanantherum*, *A. fuscum* i *A. paniculatum* subsp. *marginatum* je rutin (~11,4-127 mg po g suvog ekstrakta), dok je u ekstraktu vrste *A. rhodopeum* izokvercitrin (~3 mg po g suvog ekstrakta). Chehregani i sar. (2007) su utvrdili antimikrobnu aktivnost vodenih ekstrakata različitih delova biljaka iz roda *Allium* (lukovica, cvet, rizom, list), protiv nekoliko različitih bakterijskih vrsta (*Shigella flexinix*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*), ali efekat na *A. baumannii* nisu ispitivali. Cvetni ekstrakti vrsta roda *Allium*, vrsta *A. scabriscapum*, *A. iranicum* i *A. shelkovnikovii*, su pokazali mnogo veću antibakterijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte lukovice, pri čemu su se MIC vrednosti kretale u opsegu od 0,625-5 mg mL⁻¹, 2,5-12,5 mg mL⁻¹ i 2,5-10 mg mL⁻¹, redom (Chehregani i sar., 2007). Lukovice biljaka iz roda *Allium* su poznate po visokoj antimikrobnoj aktivnosti, ali prema rezultatima gore pomenute studije pokazano je da i cvetni ekstrakti takođe imaju potencijal da se koriste kao antibakterijski agensi. Detektovan izostanak aktivnosti ekstrakata biljaka istog roda protiv *A. baumannii* (MIC >8 mg mL⁻¹) može biti posledica činjenice da su ovde korišćeni ekstrakti pripremljeni od celih biljaka, ali i zato što nisu ispitivane više koncentracije od 8 mg mL⁻¹. Takođe, bitno je istaći da su protiv *A. baumannii* izolata testirani ekstrakti celih biljaka iz roda *Allium* koji su pripremljeni u 70 % metanolu. U radu Masoud i Gouda (2012) ispitivana je aktivnost *A. sativum* na Gram negativne bakterije, *A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *Klbsiella pneumonie*, gde je utvrđen različit opseg antibakterijske aktivnosti šest ekstrakata belog luka protiv pomenutih bakterija. Sve ispitivane bakterijske vrste su ispoljile rezistenciju na heksanske ekstrakte belog luka, dok su *P. aeruginosa* i *A. baumannii* inhibirani vodenim ekstraktima, gde su MIC vrednosti iznosile za *P. aeruginosa* 1,6 mg mL⁻¹, a za *A. baumannii* 3,1 mg mL⁻¹, dok je ista MIC vrednost utvrđena za *K. pneumonie*, ali primenom etanolnih ekstrakata (Masoud i Gouda, 2012). Ovakvi rezultati ukazuju da polarnost korišćenih rastvarača za pripremu ekstrakata ima značajnu ulogu u ostvarivanju njihovog *in vitro* efekta na bakterije, jer za razliku od ovde korišćenih metanolnih ekstrakata, u prethodno navedenim radovima korišćeni su vodeni ekstrakti lukova. Osim toga, neslaganje rezultata u literaturi sa ovde dobijenim rezultatima je najverovatnije posledica primene multiplo rezistentnih sojeva kao test organizama. Takođe, poređenjem aktivnosti ekstrakta *A. sativum* i *A. cepa* protiv *S. aureus* i *S. Enteritidis*, zabeležena je bolja antimikrobna aktivnost ekstrakta vrste *A. cepa* (Benkeblia, 2004). Isti autor je istakao da iako biljke roda *Allium* mogu biti korišćene kao potencijalni

izvor za inhibiciju rasta mikroorganizama, relativna biohemijska nestabilnost alicina, tiosulfonata i srodnih komponenti, kao i njihov jak miris, ograničavaju upotrebu ekstrakta ovih vrsta u praktične svrhe. Pored činjenice da je ispitivana antimikrobna aktivnost ekstrakata lukova pripremljenih u metanolu, a aktivnost u velikoj meri zavisi od rastvarača korišćenih prilikom ekstrakcije (Masoud i Gouda, 2012) i biohemijska nestabilnost bioaktivnih komponenti ekstrakata lukova takođe može biti jedan od razloga izostanka anti-*A. baumannii* aktivnosti ispitivanih ekstrakata biljaka roda *Allium*.

Od svih ispitivanih biljnih ekstrakata kao nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa protiv multilpo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana najbolju aktivnost ispoljili su ekstrakti vrsta *R. sanguineus* i *R. crispus*.

6.4.3. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA BIOFILM *A. baumannii* IZOLATA

Sposobnost bakterija da formiraju sesilne zajednice i da žive u formi biofilma, predstavlja veliki terapijski problem u izlečenju infekcija uzrokovanih multiplo rezistentnim bakterijama, naročito infekcija izazvanih oportunističkim patogenom poput genovrste *A. baumannii*. Testirana etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* su odabrana za ispitivanje efekata etarskih ulja na proces formiranja biofilma, s obzirom da su aktivna u niskim koncentracijama, da dokazano nisu toksična i da do sada nisu ispitana u ovom kontekstu na sojevima vrste *A. baumannii*.

Važno je naglasiti da prethodno određene MIC vrednosti predstavljaju koncentracije koje deluju na sve ćelije prisutne u kulturi, tako da je pri ispitivanju efekta etarskih ulja na biofilm ispitivan efekat kako na planktonske ćelije u medijumu tokom formiranja biofilma, tako i na one u medijumu iznad već formiranog (zrelog) biofilma. Takođe, ispitivan je efekat na proces formiranja biofilma, kao i efekat na već formirani biofilm, s obzirom da antimikrobni agensi pokazuju različit efekat na sam proces formiranja biofilma i na zreli biofilm (Knezevic i Petrovic, 2008b; Duarte i sar., 2013; Knowles i sar., 2005; Nostro i sar., 2007; Soni i sar., 2013; Szczepanski i Lipski, 2014).

6.4.3.1. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA FORMIRANJE BIOFILMA

Imajući u vidu da zreli biofilmovi poseduju visok stepen rezistencije na antimikrobne agense i dezinfekciona sredstva, prevencija formiranja biofilma svakako predstavlja važan pristup kontrole biofilmova. Prve faze u procesu formiranja biofilma su veoma kompleksni i visoko-regulisani procesi (Karatan i Watnick, 2009). Remećenje ovih procesa može predstavljati efikasan način za sprečavanje formiranja dobro organizovanih pričvršćenih ćelijskih zajednica. Prema ovde dobijenim rezultatima proces formiranja biofilma od strane multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata je u velikoj meri inhibiran primenom etarskih ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis*. Rezultati potvrđuju pretpostavku da etarska ulja ove

dve biljne vrste predstavljaju adekvatan izbor za kontrolu *A. baumannii* biofilma. Oba etarska ulja su pri koncentraciji $4 \mu\text{L mL}^{-1}$, što je $4\times\text{MIC}$ za etarska ulja *E. camaldulensis*, odnosno $2\times\text{MIC}$ za *M. communis*, inhibirala produkciju biofilma odabranih multiplo rezistentnih izolata iz rana za više od 95 %, dok je pri koncentracijama 2 i $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ takođe zabeležen značajan stepen inhibicije. Efekat etarskih ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* je bio sličan, ali je ipak nešto efikasnije bilo etarsko ulje vrste *E. camaldulensis*, koja su pri subinhibitornoj koncentraciji od $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ kod nekih multiplo rezistentnih izolata inhibirala formiranje biofilma za oko 80 %. Rezultati dobijeni za etarska ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* protiv *A. baumannii* sojeva su u saglasnosti sa rezultatima Duarte i sar. (2013) za etarska ulja *C. sativum*, gde je efekat ulja korijandera na formiranje biofilma iznosio 85 % inhibicije biomase formiranog biofilma za sve *A. baumannii* sojeve pri koncentraciji $2\times\text{MIC}$. Prema ovde dobijenim rezultatima za etarska ulja mirte i eukaliptusa postignut je veći stepen inhibicije procesa formiranja biofilma pri istim ($2\times\text{MIC}$) ili čak nižim koncentracijama testiranih ulja (MIC i $1/2\times\text{MIC}$). Kod nekih sojeva, okarakterisanih kao dobri producent biofilma, zanimljivo je primetiti povećanje stepena formiranja biofilma pri sub-inhibitornim koncentracijama etarskih ulja. Ovakav efekat je detektovan kod referentnog soja ATCC 19606 za etarska ulja obe biljne vrste, pri čemu su ulja vrste *E. camaldulensis* ovaj efekat ostavila $0,125\text{-}0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$, a ulja *M. communis* u koncentraciji $0,25\text{-}1 \mu\text{L mL}^{-1}$. Osim kod referentnog soja, povećanje stepena formiranja biofilma je detektovano i kod soja Aba-2572, ali samo primenom ulja MyB u koncentraciji $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Ovo se može objasniti činjenicom da subinhibitorne koncentracije nisu dovoljne da inhibiraju rast bakterija, a pri tome mogu da menjaju njihove površinske karakteristike, ostvaruju određene hidrofobne interakcije sa ćelijama i olakšavaju njihovu adheziju za površinu. Međutim, potrebna su detaljnija ispitivanja mehanizma uključenog u detektovanu stimulaciju rasta ćelija u formi biofilma pri subinhibitornim koncentracijama etarskih ulja.

Inhibicija inicijalnih faza u formiranju biofilma je već dokazana za neka etarska ulja i njihove bioaktivne komponente. Tako na primer, Knowles i sar. (2005) su dokazali da karvakrol inhibira rast dvo-specijskog biofilma *S. aureus* i *S. enetrica* serovar Typhimurium u ranoj fazi rasta i sprečava formiranje zrelog biofilma. Takođe je dokazano redukovano formiranje biofilma za nekoliko sojeva vrsta *S. aureus* i *S. epiderimidis* u prisustvu subletalnih koncentracija etarskog ulja origana, kao i bioaktivnih komponenti karvakrola i timola (Nostro i sar., 2007). Slični rezultati su dobijeni i za sojeve *Salmonella* Typhimurium u prisustvu subletalnih koncentracija karvakrola i etarskih ulja majčine dušice i origana (Soni i sar., 2013).

Osim efekta na proces formiranja biofilma, etarska ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* su ispoljila značajan efekat na planktonske ćelije u medijumu tokom samog procesa formiranja biofilma, inhibirajući njihov rast i smanjujući njihovu metaboličku aktivnost. Ovo je od značaja, jer su upravo planktonske ćelije te koje kolonizuju nove površine i omogućavaju širenje biofilma na udaljena mesta. Inhibitorna aktivnost etarskih ulja mirte i

eukaliptusa je pri MIC koncentracijama inhibirala planktonske ćelije u medijumu za više od 90 %, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim prilikom ispitivanja osetljivosti *A. baumannii* na nekonvencionalne antimikrobne agense. Etarska ulja *M. communis* su već pri subinhibitornoj koncentraciji ($0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$) inhibirala planktonske ćelije u medijumu tokom formiranja biofilma za više od 50 %, dok su etarska ulja *E. camaldulensis* pri subinhibitornoj koncentraciji $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ inhibirala više od 70 % *A. baumannii* planktonskih ćelija. Slično efektu na proces formiranja biofilma, etarska ulja vrste *M. communis* su uticala na povećanje brojnosti planktonskih ćelija u medijumu tokom procesa formiranja biofilma kada su primenjena u subinhibitornim koncentracijama ($0,1-0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$) na soj Aba-8781. Ovakvi rezultati ukazuju da se pomenuti efekat, kako na planktonske, tako i na ćelije biofilma u većini slučajeva nalazi u granicama standardne greške, zavisi od soja, kao i od hemijskog sastava ulja. Prema ovde dobijenim rezultatima detektovan je značajan efekat, koji je takođe okarakterisan i kao preventivni efekat etarskih ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* na proces formiranja biofilma, imajući u vidu da je inkubacija *A. baumannii* izolata sa etarskim uljima uticala na redukciju ćelija tokom formiranja biofilma u odnosu na kontrolu. Sličnu aktivnost su detektovali i Duarte i sar. (2013) takođe za *A. baumannii* sojeve, ali pri nešto višim koncentracijama etarskog ulja korijandera ($2 \times \text{MIC}$).

Detektovana inhibitorna aktivnost etarskih ulja na proces formiranja biofilma je najverovatnije posledica njihovog hemijskog sastava, odnosno njihovih bioaktivnih komponenti koje ispoljavaju efekte na određene molekule i stadijume u procesu formiranja biofilma. Pelletier (2012) je dokazao inhibitorni efekat tri komponente etarskih ulja (eugenol, timol i karvakrol) na biofilm vrste *A. baumannii* formiran na abiotičkim površinama. Antibiofilm efekat ove tri bioaktivne komponente je vremenski zavistan, jer je nakon inkubacije od 10 minuta 0,2 % eugenola i 0,3 % timola i karvakrola u potpunosti eliminisalo sve vijabilne ćelije *A. baumannii*. Smatra se da eugenol, timol i karvakrol inaktiviraju bakterijski rast u formi biofilma, na sličan način kao i prilikom inhibicije planktonskih ćelija (Burt, 2004). Osim toga, neki autori pretpostavljaju da se hidroksilna grupa eugenola vezuje za proteine i na taj način sprečava njihovu enzimsku aktivnost (Vincent i sar., 2009), dok je za karvakrol dokazano da smanjuje proton-motornu silu i količinu ATP molekula unutar ćelija (Tomaras i sar., 2003). Međutim, pokazano je da komponente etarskih ulja citronelol i cinamil-aldehid imaju stimulišući efekat na proces formiranja biofilma pojedinih bakterijskih vrsta (*Escherichia coli* ATCC 33456, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. putida* KT2440, *P. fluorescens*) pri subinhibitornim koncentracijama ($\leq 100 \text{ ppm}$, odnosno nižim do $\sim 0,1 \mu\text{L mL}^{-1}$) (Niu i Gilbert, 2004).

Ono što je takođe veoma bitno još jednom istaći je da MIC vrednosti dobijene korišćenjem klasične metode, prilikom rasta *A. baumannii* u tečnoj kulturi, predstavljaju ukupan efekat etarskih ulja na planktonske ćelije i one u formi biofilma. Dobijene vrednosti za inhibitorne koncentracije za proces formiranja biofilma bile su više od MIC vrednosti za ukupan rast, a sličnije dobijenim MBC vrednostima. Suprotno je primećeno za planktonske

ćelije, koje su bile inhibirane subinhibitornim koncentracijama ulja. Na osnovu ovoga, jasno je da prilikom kontrole rasta *A. baumannii* veći problem predstavlja rast ćelija u formi biofilma, nego planktonske ćelije. Prilikom očitavanja MIC najčešće se koristi metoda detekcije odsustva vidljivog rasta, tj. prisustva planktonskih ćelija suspendovanih u medijumu. Ako se koristi neki od supstrata, kao što je u ovom slučaju TTC, samo površinske ćelije biofilma učestvuju u njegovoj konverziji. Konačno, čak i ako MIC vrednosti koje se detektuju na ovaj način najverovatnije i jesu inhibitorne, to u slučaju postojanja biofilma, ne predstavlja koncentraciju koja će omogućiti eradikaciju patogena zbog preživljavanja bakterija perzistera koje uz zaštitu od površinskih slojeva biofilma imaju i smanjenu metaboličku aktivnost. Na osnovu navedenog, određivanje efektivnih koncentracija, kada su u pitanju infekcije u kojima postoji biofilma (npr. infekcije rana), trebalo bi biti bazirano na određivanju koncentracija koje inhibiraju formiranje biofilma, ili bar na MBC vrednostima.

Dobijeni rezultati primenom etarskih ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* su veoma značajni sa stanovišta prevazilaženja problema formiranja biofilma vrste *A. baumannii* sojeva. Inkorporacijom etarskih ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* u superinhibitornim koncentracijama u formulacije dezinfekcionih sredstava, kao i sredstava za čišćenje površina, prvenstveno u bolničkoj sredini, prenošenje planktonskih ćelija može biti redukovano, a takođe mogu se inhibirati početni stadijumi procesa formiranja biofilma. Pored toga, ova ulja bi trebalo proučiti i u *ex vivo* i *in vivo* sistemima na modelu rana, pošto imaju potencijal inhibicije formiranja biofilma ispitivanog oportunističkog patogena.

6.4.3.2. EFEKAT ETARSKIH ULJA NA FORMIRANI BIOFILM

Dobijeni rezultati ispitivanja etarskih ulja na formirani biofilm ukazuju da su etarska ulja biljnih vrsta iz porodice Myrtaceae efikasna u uklanjanju dvadesetčetvoročasovnog biofilma *A. baumannii*. Utvrđen efekat je veoma značajan, jer uklanjanje već formiranog, zrelog biofilma predstavlja veći izazov u odnosu na njegovu inhibiciju u ranim fazama. Ekstracelularni matriks formiranog biofilma otežava prolaz i inaktivira antimikrobne agense i njihove bioaktivne komponente, a osim toga ćelije u dubljim slojevima biofilma su metabolički slabo aktivne, što svakako utiče na smanjenje efikasnosti antimikrobnih agenasa, koji se konvencionalno primenjuju. Primenom ovde testiranih etarskih ulja na *A. baumannii* izolate okarakterisane kao veoma adherentne, postignut je efekat redukcije zrelog biofilma, pri koncentracijama 2 i 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ gde su etarska ulja *M. communis* uklonila 53-96 % biofilma, dok je *E. camaldulensis* pri istim koncentracijama uklonio 60-100 % biofilma. Tri etarska ulja (EuB, MyHN i MyK) su čak pri koncentracijama 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (što predstavlja $1/8 \times \text{MIC}$ do $1/32 \times \text{MIC}$, u zavisnosti od soja) uklonila više od 50 % biofilma starog 24 h, formiranog od strane soja Aba-4804, koji je okarakterisan kao snažan producent biofilma, jer je za 24 h formirao i do 3 puta više biofilma u odnosu na pojedine veoma adherentne *A. baumannii* izolate. Maksimum uklonjenog dvadesetčetvoročasovnog biofilma ovog soja pri

2×MIC koncentraciji etarskih ulja, odnosno 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ za EuB iznosio je 100 %, a za MyHN iznosio je 96 % primenom 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ koncentracije ulja. Bitno je istaći i da je i primenom nižih koncentracija ovih ulja (1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ i 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, odnosno 1×MIC) zabeležen nešto niži, ali takođe značajan stepen smanjenja biomase biofilma. Prema rezultatima, Duarte i sar. (2013) etarsko ulje korijandera je ispoljilo inhibitorni efekat na *A. baumannii* sojeve koji dobro produkuju biofilm, pri koncentraciji 4×MIC, a maksimum inhibicije je iznosio 75-81 %. Takođe, njihov stepen uklanjanja je bio niži za kliničke izolate (iznosio je oko 66 %) u odnosu na referentne sojeve, dok je ovde dobijen efekat etarskih ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* utvrđen za bolničke i ambulantne *A. baumannii* izolate iz rana. Sva ovde testirana etarska ulja su se pokazala efikasna u opsegu koncentracija 2-4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a neka čak i pri nižim koncentracijama. Sposobnost uklanjanja biofilma etarskih ulja mirte i eukaliptusa je dokazana pri inhibitornim i subinhibitornim koncentracijama, dok su Szczepanski i Lipski (2014) istu aktivnost detektovali pri subletalnim koncentracijama ulja korijandera, što potvrđuje da su ovde testirana etarska ulja veoma efikasna. Duarte i sar. (2013) su dokazali da nakon izlaganja biofilma *A. baumannii* sojeva, starog 24 h i 48 h, delovanju etarskog ulja *C. sativum*, dolazi do smanjenja njegove biomase, kao i metaboličke aktivnosti ćelija biofilma, pri svim testiranim koncentracijama (0,1 do 4×MIC), čak i pri subinhibitornim koncentracijama. Zabeležen efekat na 24 h starom *A. baumannii* biofilmu, iznosio je 90 % redukcije ukupne biomase, primenom etarskog ulja korijandera u trajanju od 24 h u koncentracijama 2×MIC i 4×MIC (Duarte i sar., 2013). Na osnovu ovde dobijenih rezultata i podataka dostupnih u literaturi testirana etarska ulja vrste *M. communis* sa lokaliteta Herceg Novi i Kotor i vrste *E. camaldulensis* sa lokaliteta Bar mogu biti svrstana u grupu etarskih ulja sa anti-biofilm aktivnošću i to protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata, dok su ulja MyB i EuHN ipak u nižim koncentracijama delovala stimulišuće na formirani biofilm kod nekih sojeva. Pojedina etarska ulja uzrokuju pojavu efekta stimulacije i pojačanja rasta bakterija u formi biofilma, odnosno dovode do jačanja formiranog biofilma (Sandasi, 2008; Sandasi i sar., 2011). Ovaj efekat su ispoljila i ovde testirana etarska ulja prilikom uklanjanja *A. baumannii* biofilma određenih multiplo rezistentnih izolata iz rana, ali pri subinhibitornim koncentracijama. Ovaj fenomen se može objasniti pretpostavkom da niže koncentracije etarskih ulja mogu dovesti do izmene karakteristika površine ćelije, kao što je već napomenuto za proces formiranja biofilma, ali kod formiranog biofilma mogu dovesti i do indukcije zaštitnih mehanizama ćelija. Poznato je da su mehanizmi rezistencije kompleksni i još uvek upotpunosti nerazjašnjeni, ali može se pretpostaviti da ova etarska ulja i njihove bioaktivne komponente u sub-inhibitornim koncentracijama slabije difunduju kroz matriks biofilma. Takođe, u dubljim slojevima mogu uticati na ćelije oštećenjem njihovih membrana, zbog čega nije neophodno da ćelije budu metabolički aktivne da bi bile uništene, a metabolička aktivnost je preduslov za delovanje većine konvencionalnih antibiotika. Rezultati nekih autora ukazuju da etarska ulja korijandera, majčine dušice, origana i cimeta, poseduju antimikrobne karakteristike protiv biofilm-formirajućih izolata vrsta *A. baumannii*, kao i u

uklanjanju formiranog biofilma (Duarte i sar., 2013; Szczepanski i Lipski, 2014). Prema dobijenim rezultatima, etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* predstavljaju potencijalne agense za odvajanje i destabilizaciju zrelog biofilma, budući da je većina konvencionalnih antibiotika oko 1000 puta manje efikasna protiv bakterija koje se nalaze u formi biofilma, u odnosu na njihovu efikasnost kada se bakterije nalaze u suspenziji (Melchior i sar., 2006).

Veći stepen uklanjanja je detektovan primenom istih koncentracija svih etarskih ulja mirte i eukaliptusa na metabolički aktivne planktonske ćelije prisutne u medijumu iznad biofilma. Redukcija metaboličke aktivnosti planktonskih ćelija, tj. ćelija odvojenih u procesu životnog ciklusa formiranog biofilma je iznosila najmanje 80 % pri koncentraciji $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ etarskih ulja, dok je primenom $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ koncentracije etarskih ulja *E. camaldulensis* u toku 24 h, redukcija planktonskih ćelija kliničkih *A. baumannii* izolata biofilma starog 24 h iznosila čak više od 95 %. Ovakav efekat etarskih ulja na metabolički aktivne planktonske ćelije u medijumu iznad formiranog biofilma je najverovatnije posledica dostupnosti ćelija bioaktivnim komponentama etarskih ulja, pošto oko njih nema matriksa koji ih štiti. Takođe, činjenica je da su ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta osetljivije na etarska ulja mirte i eukaliptusa, jer se morfološke i fiziološke karakteristike ćelija razlikuju u različitim fazama njihovog rasta (Kwieciński i sar., 2009; Longbottom i sar., 2004). Konačno, prisustvo visokih koncentracija etarskih ulja može da favorizuje adheziju bakterija i spreči proces odvajanja ćelija od biofilma. Međutim, etarska ulja vrste *M. communis* su uzrokovala povećanje ne samo mase biofilma, već i biomase planktonskih ćelija u medijumu iznad formiranog biofilma pri subinhibitornim koncentracijama ($0,125$ i $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$) i to kod nekoliko multiplo rezistentnih sojeva (Aba-4804, Aba-5055, Aba-8781 i ATCC 19606), prvenstveno onih okarakterisanih kao dobri producenti biofilma. Etarsko ulje *E. camaldulensis* (EuHN) je pri istim koncentracijama takođe uzrokovalo povećanje biomase planktonskih ćelija u medijumu kod soja Aba-8781. Ovakav efekat subinhibitornih koncentracija može biti posledica sposobnosti ćelija formiranog biofilma da detektuju prisustvo subinhibitornih koncentracija etarskih ulja i njihovih komponenti, što favorizuje odvajanje ćelija od biofilma u cilju njihovog preživljavanja i pronalaženja povoljnije sredine u kojoj će biti omogućeno ponovno formiranje biofilma.

Dobijeni rezultati potvrđuju da testirana etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* poseduju značajnu antibakterijsku i anti-biofilm aktivnost i da ih treba uzeti u razmatranje prilikom razvoja budućih dezinficijensa i/ili terapeutika za kontrolu širenja *A. baumannii* sojeva. Osim toga, dobijeni rezultati ukazuju da je za efikasnu inhibiciju i uklanjanje biofilma potrebno koristiti etarska ulja u super-MIC koncentracijama, što nije teško ostvariti s obzirom na dobijene MIC vrednosti ovih ulja. Imajući u vidu da su analizirani *A. baumannii* sojevi poreklom iz rana, kao i njihovu utvrđenu veću sposobnost formiranja biofilma u odnosu na izolate iz prirodne sredine, etarska ulja kao prirodni antimikrobni agensi predstavljaju potencijalno rešenje za tretman infekcija rana, naročito

hroničnih rana kod imunokompromitovanih pacijenata. Etarska ulja mogu biti inkorporirana u flastere za previjanje ovakvih rana, čime bi uticali na sprečavanje formiranja biofilma i/ili na redukciju, pa i eradikaciju zrelog biofilma u rani. Zanimljivo je spomenuti da su još Aboridžini stavljali smole eukaliptusa na posekotine i ogrebotine, dok su list biljke eukaliptusa koristili za žvakanje, čime su zapravo prali zube, a između ostalih korisnih primena ove biljke služila im je i za lečenje zubobolje (Barr, 1988; Clarke, 2014). Imajući u vidu tradicionalnu primenu, kao i činjenicu da je prva faza u nastanku zubnog karjesa formiranje dentalnog plaka, neophodno je dalje proučavanje primene etarskih ulja, prvenstveno eukaliptusa, putem njihove inkorporacije u zubne paste radi unapređenja oralne higijene.

6.4.4. BIOAUTOGRAFIJA ETARSKIH ULJA I BILJNIH EKSTRAKATA

Bioautografska TLC metoda korišćena je za preliminarnu identifikaciju komponenti etarskog ulja mirte, eukaliptusa i odabranih vrsta kleke, odgovornih za anti-*A. baumannii* aktivnost. Ova metoda predstavlja relativno efikasan način skrininga i detekcije antibakterijske aktivnosti komponenti etarskih ulja. TLC hromatogrami etarskih ulja mirte i eukaliptusa pokazali su da su ulja veoma bogata terpenskim jedinjenjima, dok razlika u kvalitativnom sastavu etarskih ulja sa različitih lokaliteta nije uočena primenom ove metode. Takođe, primećena je značajna razlika u hemijskom sastavu etarskih ulja *M. communis*, *E. camaldulensis* i biljaka roda *Juniperus*. Tankoslojna hromatografija odabranih etarskih ulja je izvedena paralelno sa bioautografskom analizom. Ulja su razvijena na tri paralelne ploče, pri čemu je jedna korišćena za vizuelizaciju komponenti, druga za utvrđivanje antimikrobnog efekta cele trake, a treća za utvrđivanje antimikrobnog efekta pojedinačnih mrlja, tako da su svi eksperimentalni uslovi bili isti. Kombinacija metode tankoslojne hromatografije i bioautografije etarskih ulja je relativno efikasan način skrininga i detekcije antibakterijske aktivnosti. Ovakav pristup omogućava potencijalnu identifikaciju bioaktivnih komponenti i/ili grupa terpenskih jedinjenja odgovornih za antimikrobnost etarskih ulja, što pokazuju i dobijeni rezultati.

Etarska ulja vrsta roda *Juniperus* su u najvećem procentu posedovala terenske ugljovodonike - *J. oxycedrus* (94,6 %), *J. phoenicea* (95,9 %), *J. sabina* (78,7 %), *J. sibirica* (98 %) i *J. foetidissima* (74,7 %). TLC hromatografijom pokazano je da sadrže terenske ugljovodonike koji su se izdvojili pri vrhu hromatograma, što je naravno manje informativno od sastava dobijenog GC-MS analizom. Kod etarskog ulja *J. foetidissima* koje je ispoljilo najbolju aktivnost u odnosu na sva ostala etarska ulja biljaka roda *Juniperus*, identifikovana je komponenta 4-terpieol. Ova komponenta je bila i prema GC-MS analizi dominantno zastupljena u ovom etarskom ulju, što može predstavljati objašnjenje njegove izražene anti-*A. baumannii* aktivnosti (MIC 1-2 $\mu\text{L mL}^{-1}$) u poređenju sa ostalim etarskim uljima ovog roda (MIC $\geq 4 \mu\text{L mL}^{-1}$). Međutim, kombinovanjem ovih rezultata sa bioautografskom analizom

etarskih ulja pokazano da je su za antibakterijsku aktivnost protiv *A. baumannii* izolata najodgovornije polarne terpeneske komponente, tačnije mono- i seskviterpenski alkoholi i terpeneski aldehidi i ketoni. Dominacija terpeneskih ugljovodonika i estara odgovorna je za detektovanu slabu aktivnost ulja, pošto je poznato da predstavljaju grupu jedinjenja koju karakteriše odustvo ili slaba antimikrobna aktivnost (Bagamboula i sar., 2004; Koutsoudaki i sar., 2005). Rezultati ukazuju na postojanje sličnosti u ispoljenoj antimikrobnoj aktivnosti između bioautografskog eseja različitih etarskih ulja (*M. communis*, *E. camaldulensis*, *J. sabina* i *J. foetidissima*). Etarsko ulje *J. sabina* ispoljilo slabu antimikrobnu aktivnost verovatno kao posledicu antagonizma između komponenti prisutnih u ovom etarskom ulju, jer utvrđena MIC vrednost ovog ulja protiv soja ATCC 19606 iznosi $>4 \mu\text{L mL}^{-1}$.

U etarskom ulju *M. communis* uočeno je 6 različitih mrlja, koje su identifikovane kao α -terpineol, linalol, 1,8-cineol, metil-eugenol, grupa acetilovanih monoterpeneskih alkohola (mirtenil-acetat, linalil-acetat, geranil-acetat, α -terpinil-acetat, neril-acetat) i α -pinen. Dobijeni rezultati su u skladu sa GC-MS analizom, pošto su ova jedinjenja dominantna u ulju. Bioautografskom analizom utvrđeno je da polarne terpeneske komponente poseduju izraženu antibakterijsku aktivnost, α -terpineol i linalol, prisutne u oba etarska ulja vrste *M. communis*, poseduju izraženu antibakterijsku aktivnost. Antibakterijska aktivnost ostalih identifikovanih terpeneskih komponenti u uljima ove vrste (1,8-cineol, metil-eugenol, acetilovani monoterpenski alkoholi i α -pinen) nije detektovana primenom bioautografske metode. Prema rezultatima ranijih istraživanja MIC vrednost za linalol iznosi 0,2-3,2 mg mL⁻¹ protiv *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Sonboli i sar., 2006), terpineol je istu aktivnost ispoljio u koncentraciji 0,1-1,6 mg mL⁻¹ protiv periodontopatogenih i kariogenih bakterija (Park i sar., 2012), dok 1,8-cineol deluje pri koncentracijama 1,8-7,2 mg mL⁻¹ protiv različitih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterijskih vrsta (Sonboli i sar., 2006; Rosato i sar., 2007), što je u skladu sa detektovanim aktivnošću.

U etarskom ulju *E. camaldulensis* dominantne su takođe polarne terpeneske komponente (linalol, terpinen-4-ol i α -terpineol), koje formiraju jedinstvenu mrlju na TLC ploči. Najveća mrlja na TLC ploči je identifikovana kao spatulenol, a detektovana je i mrlja kripton, što je u saglasnosti sa rezultatima GC-MS analize, koja je pokazala da su najdominantnije komponente etarskog ulja eukaliptusa, spatulenol i kripton. Mrlja pri vrhu hromatograma potiče od izrazito nepolarnih jedinjenja, odnosno terpeneskih ugljovodonika, od kojih je najzastupljeniji p-cimen. Zanimljive su i ljubičasta i plava mrlja na sredini hromatograma, čije R_f vrednosti odgovaraju oksidovanim monoterpenima 1,8-cineolu i timolu. Bioautografija etarskih ulja vrste *E. camaldulensis* je pokazala da antibakterijsku aktivnost poseduju polarne terpeneske komponente i spatulenol. Dobijeni rezultati za sva testirana etarska ulja ukazuju da su njihove glavne komponente posedovale antimikrobnu aktivnost

(spatulenol, α -terpineol i linalol), što je u saglasnosti sa podacima drugih autora (Horváth i sar., 2010).

Na hromatogramima etarskih ulja mirte i eukaliptusa, jasno se može uočiti da je mrlja terpenskih ugljovodonika kod etarskog ulja *E. camaldulensis* veća u odnosu na istu mrlju detektovanu kod etarskog ulja *M. communis*, što je u saglasnosti sa rezultatima GC-MS analize prema kojim etarska ulja mirte sadrže samo α -pinen, limonen, p-cimen, α -humulen i *trans*-kariofilen iz grupe terpenskih ugljovodonika, što iznosi 7,2-14 %, dok je kod etarskih ulja eukaliptusa detektovano čak 17 terpenskih ugljovodonika, koji su zastupljeni u dvostruko većem procentu (24,2-27,7 %). Ovim se može objasniti i nešto bolji anti-*A. baumannii* efekat ulja eukaliptusa. Međutim, dobijeni rezultati za etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* ne znače da su samo i isključivo komponente spatulenol, α -terpineol i linalol odgovorne za detektovanu antibakterijsku aktivnost etarskih ulja. Ove komponente svakako mogu biti okarakterisane kao najdominantnije i odgovorne za postizanje antimikrobnog efekta etarskih ulja, ali i ostale komponente detektovane GC-MS analizom sastava ulja, takođe mogu posedovati značajnu ulogu u antimikrobnom efektu. Komponente koje su procentualno manje zastupljene u testiranim etarskim uljima nisu posedovala očigledan antibakterijski efekat u ispitivanoj koncentraciji primenom bioautografske metode. Razlog za to može biti i činjenica da je za bioautografsku analizu etarsko ulje primenjeno u količini od 0,08 μ l (što je najmanje jedan red veličine manje u odnosu na MIC vrednosti), te da su pomenute komponente zastupljene u tragovima, i samim tim nisu mogle ispoljiti značajniji efekat. Kao što se može primetiti, polarne komponente etarskih ulja pokazale su se kao aktivne, za razliku od ostalih komponenti. Razlog za to može biti korišćena metoda, pošto ova hidrofilna jedinjenja mogu lakše da difunduju kroz polutečnu podlogu i tako ispolje svoju aktivnost, za razliku od hidrofobnih jedinjenja. Takođe, TLC ploče su zagrevane 5 minuta na 90 °C, što može dovesti do isparavanja nekih lako isparljivih biološki aktivnih komponenti, zbog čega se njihova aktivnost može prevideti u bioautografskoj analizi. Tako je moglo doći do isparavanja npr. 1,8-cineola, timola i kriptona, koje su prema rezultatima bioautografske analize nisu pokazale antimikrobnu aktivnost. Na osnovu ovoga jasno je da polarni terpeni učestvuju značajno u antimikrobnoj aktivnosti, ali se ne može negirati i potencijalna aktivnost drugih komponenti, koja nije detektovana bioautografijom. Ostale bioaktivne komponente, čija antibakterijska aktivnost protiv *A. baumannii* nije detektovana metodom bioautografije, mogu delovati samostalno i/ili sinergistički sa drugim komponentama etarskog ulja. Dakle, jasno je da je antibakterijska aktivnost etarskih ulja u vezi sa komponentama koje su dominantno zastupljene u nekom etarskom ulju, ali isto tako efekat manje zastupljenih komponenti takođe treba biti uzet u obzir prilikom traganja za nekonvencionalnim antimikrobnim agensima.

Na osnovu dobijenih rezultata jasno je da je za kvalitativno i kvantitativno utvrđivanje sastava etarskih ulja, savremenija GC-MS metoda značajno bolja u odnosu na TLC analizu.

Međutim, kombinacija ove jednostavne tehnike sa nekim drugim mikrobiloškim metodama, može obezbediti brz, efikasan i jednostavan skrining za utvrđivanje karakteristika i sastava ulja, koji mogu predstavljati smernice za dalja detaljnija ispitivanja onih ulja koja su se pokazala efikasna. I pored gore navedenih nedostataka, primena ovakvih tehnika, može smanjiti potrošnju vremena i novca, jer omogućava odabir aktivnih i eliminaciju neaktivnih i/ili slabo aktivnih etarskih ulja, i njihovih aktivnih komponenti.

6.4.5. OSETLJIVOST *A. baumannii* IZOLATA NA BIOLOŠKI AKTIVNE KOMPONENTE PRIRODNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA

Radi utvrđivanja i identifikacije biološki aktivnih komponenti odgovornih za antimikrobnu aktivnost biljnih ekstrakata, odabrane su četiri čiste bioaktivne komponente katehin, kvercetin, cimetna kiselina i emodin. Ove komponente su odabrane prema kriterijumu njihove zastupljenosti u ekstraktima biljaka kod kojih je detektovana antimikrobna aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata, kao i na osnovu podataka ranije objavljenih u literaturi.

Među komponentama koje su do sada okarakterisane kao aktivne protiv bakterijskih ćelija nalaze se flavonoidne komponente kao što su kvercetin, katehin i njihovi derivati. Katehini i veliki deo flavonoida se sintetišu od strane biljaka u svrhu borbe protiv bakterijskih infekcija. Iz tog razloga nije iznenađenje da ove komponente ispoljavaju *in vitro* antimikrobnu aktivnost (Gradisar i sar., 2007). Katehini ispoljavaju antibakterijsku aktivnost inhibicijom DNK giraze. Specifično vezivanje odabranih katehina je pokazano za N-terminalni fragment DNK giraze B, odnosno interakcijom sa njenim ATP-vezujućim mestom (Gradisar i sar., 2007). Osim toga, katehini poseduju sposobnost obnavljanja osetljivosti bakterija rezistentnih na antibiotike kao što su tetraciklini, beta-laktamski antibiotici i inhibitori beta-laktamaza (Roccaro i sar., 2004; Stapleton i sar., 2004; Zhao i sar., 2003). Standard katehina poseduje značajan negativan efekat i na produkciju pirocinanina i elastaze, proces formiranja biofilma, kao i na ekspresiju *quorum sensing* gena *lasB* and *rhlA* i ključnih *quorum sensing* regulatornih gena *lasI*, *lasR*, *rhlI*, i *rhlR* kod *P. aeruginosa* PAO1. Katehin takođe može uticati na percepciju *quorum sensing* signala *N*-butanoil-L-homoserin laktona od strane RhlR, što može dovesti do redukcije *quorum sensing* odgovora (Vandeputte i sar., 2010). Kao što je već napomenuto, katehin je produkt viših biljaka i iz tog razloga Vandeputte i sar. (2010) predlažu da katehin može činiti prvu liniju odbrane protiv napada patogenih bakterija, delujući ciljano na mehanizme *quorum sensing* odgovora i posredno na produkciju faktora virulencije. Ovakva aktivnost katehina i njegovih derivata je od velike važnosti zbog rastuće bakterijske rezistencije na konvencionalne antibiotike. U svim ovde testiranim ekstraktima *Rumex sanguineus* katehin je predstavljao najdominantniju komponentu, a bio je prisutan u količini od 3487 do 16631 µg po g suvog ekstrakta. Ekstrakt *R. sanguineus* (4Z_H_p) sa najvećim sadržajem katehina (16631 µg po g suvog ekstrakta)

ispoljio je i najbolju anti-*A. baumannii* aktivnost. Međutim, korišćen rastvor katehina pripremljen u DMSO-u, nije pokazao antibakterijsku aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana čak ni u najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Mabe i sar. (1999) su potvrdili antibakterijsku aktivnost derivata katehina protiv 110 kliničkih izolata vrste *H. pylori*. Njihove MIC vrednosti za epikatehin galat su iznosile 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, za epigalokatehin 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i za epikatehin 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Mabe i sar., 1999). Neke studije su otkrile da su *Staphylococcus* i Gram negativne štapičaste bakterije (npr. *E. coli*) u različitoj meri osetljive na epigalokatehin galat, gde su MIC vrednosti iznosile 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za *Staphylococcus* i >800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za *E. coli* (Hamilton-Miller, 1997; Yoda i sar., 2004). Ovakvi rezultati odgovaraju dobijenim rezultatima za *A. baumannii*, jer je ispitivana aktivost Gram negativne bakterije pri čemu su MIC vrednosti bile >256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Osim toga, antibakterijska aktivnost katehina je okarakterisana kao nespecifična, sa ograničenom selektivnošću prema različitim vrstama. Na osnovu toga rezultati ukazuju na to da sam katehin ne predstavlja dobro rešenje kada je u pitanju tretman infekcija izazvanih multiplo rezistentnim izolatima vrste *A. baumannii*.

Osim katehina, ispitana je i antibakterijska aktivnost kvercetina kao još jedne od bioaktivnih komponenti iz klase flavonoida. Kvercetin je detektovan samo u jednom ekstraktu vrste *R. sanguineus* (4NZ_R) u količini 63,8 μg po g suvog ekstrakta. Metanolni i DMSO rastvori kvercetina nisu pokazali antibakterijsku aktivnost protiv multiplo rezistentnih izolata *A. baumannii*, jer su MIC vrednosti bile veće od 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sličan rezultat su dobili i Nitiema i sar. (2012) koji su takođe ispitivali aktivnost kvercetina protiv humanih patogena (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Infantis). Rastvor kvercetina u DMSO-u je ispoljio antibakterijski efekat primenom disk difuzione metode protiv *E. coli*, gde je prečnik zone inhibicije iznosio $8,5 \pm 2,12$ mm pri koncentraciji 100 mg mL^{-1} , dok prema ostalim humanim patogenima katehin nije ispoljio antibakterijsku aktivnost (Nitiema i sar., 2012). Nasuprot ovim rezultatima, u studiji koju su sproveli Vijaya i Ananthan (1996), oralna primena 142,9 mg kg^{-1} kvercetina zaštitila je zamorčice od indukovane infekcije bakterijom iz roda *Shigella* koja je bila fatalna za netretiranu, kontrolnu grupu životinja. Iako postoje dokazi da kvercetin poseduje antibakterijsku aktivnost, prema ovde dobijenim rezultatima, kada se radi o tretmanu infekcija uzrokovanih multiplo rezistentim *A. baumannii* izolatima, biološki aktivna komponenta kvercetin ne predstavlja adekvatno rešenje.

Ispitivana je i antimikrobna aktivnost metanolnog i DMSO rastvora cimetine kiseline protiv *A. baumannii* izolata iz rana, kao jedne od bioaktivnih komponenti ekstrakata biljaka roda *Allium*. Prema dobijenim rezultatima cimetna kiselina pri koncentraciji 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ takođe nije posedovala antibakterijsku aktivnost protiv ni jednog multiplo rezistentnog soja *A. baumannii*. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima Alves i sar. (2013), koji su utvrdili da su MIC vrednosti za kliničke izolate Gram negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morgani*, *Pasteurella multocida*) bile veće od 1 mg mL^{-1} , dok je samo

za vrstu *Neisseria gonorrhoeae* MIC vrednost iznosila 1 mg mL⁻¹. Hawkins (2014) je dokazao da cimetna kiselina poseduje antimikrobnu aktivnost protiv *L. monocitogenes* i *E. coli* u visokoj koncentraciji od 2 %, dok su Nascimento i sar. (2000) pokazali da je u koncentraciji 5 % cimetna kiselina posedovala antimikrobnu aktivnost protiv sojeva vrsta *S. aureus*, *C. albicans*, *E. arogenes* i *E. coli*. Ipak, primenjene koncentracije su veoma visoke, posebno kada se u obzir uzme da je u pitanju čista supstanca. Hemaiswarya i Doble (2010) su pokazali da je 1mM fenilpropanoida, među kojima je testirana i cimetna kiselina (148 µg mL⁻¹), ispoljili antibakterijski efekat protiv bakterijskih vrsta *E. arogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, pri čemu je oštećenje bakterijskih membrana iznosilo 60-70 %. Takođe, oni su primetili određenu pravilnost da je hidrofobnijim ćelijama u većoj meri bio oštećen ćelijski zid. Ipak, rezultati dobijeni za testirane *A. baumannii* sojeve ukazuju na činjenicu da ni cimetna kiselina ne predstavlja odgovarajuće rešenje.

Emodin je bioaktivna komponenta koja je u velikoj meri prisutna u ekstraktima biljaka *Rumex crispus* (Al-Nuri i sar., 1996), a koji su ovde ispoljili značajnu antibakterijsku aktivnost protiv *A. baumannii*. Biološki aktivna komponenta emodin je u ekstraktima herbe i rizoma vrste *R. crispus* detektovana u količini 2271-2601 µg g⁻¹ suvog ekstrakta i iz tog razloga ispitana je i aktivnost rastvora emodina u DMSO-u. Međutim, kada je primenjen sam, ni emodin nije ispoljio antibakterijsku aktivnost prema multiplo rezistentnim *A. baumannii* izolatima iz rana u ispitivanim koncentracijama. Prema rezultatima Chukwujekwu i sar. (2006) emodin poseduje antimikrobnu aktivnost protiv Gram pozitivnih bakterija *Bacillus subtilis* (MIC je 7,8 µg mL⁻¹) i *Staphylococcus aureus* (MIC je 3,9 µg mL⁻¹), ali ne i prema negativnim bakterijama *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* ni pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 500 µg mL⁻¹. Ovo je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima za multiplo rezistentne izolate *A. baumannii*. Ovi rezultati se razlikuju od rezultata dobijenih u studiji u kojoj je ispitivana antibakterijska aktivnost emodina protiv pet Gram pozitivnih (*B. cereus*, *B. subtilis*, *M. kristinae*, *S. aureus* i *S. epidermidis*) i četiri Gram negativne bakterije (*E. coli*, *P. vulgaris*, *E. arogenes* i *S. sonnei*) gde su se MIC vrednosti kretale od 62,5 do 250 µg mL⁻¹ (Coopoosamy i Magwa, 2006). Bez obzira na to, jasno je da emodin primenjen kao čista supstanca ne ispoljava zadovoljavajuću aktivnost na multiplo rezistentne izolate ispitivane u ovom radu.

Radi utvrđivanja i identifikacije biološki aktivnih komponenti ogovornih za antimikrobnu aktivnost etarskih ulja, testirane su njihove bioaktivne komponente. Terpenski ugljovodonici predstavljaju grupu jedinjenja za koju nije svojsvena karakteristika visoke antimikrobne aktivnosti, što je i ovde potvrđeno bioautografskom analizom etarskih ulja vrsta *M. communis*, *E. camaldulensis* i vrsta roda *Juniperus* protiv *A. baumannii*. Osim toga, utvrđene MIC vrednosti bioaktivnih komponenti etarskih ulja iz klase terpenskih ugljovodonika protiv *A. baumannii* izolata su za α-terpinen, γ-terpinen i terpinolen bile veće od 32000 µg mL⁻¹, što je u saglasnosti i sa rezultatima bioautografske metode. Nešto bolju antibakterijsku aktivnost ispoljile su komponente α-pinen, (R)-(+)-limonen i 3-karen pri

koncentracijama u opsegu od 1682 do 6727 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Utvrđena MIC vrednost kada je komponenta α -pinen primenjena pojedinačno na *A. baumannii* iznosi 2000-3364 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok je prema rezultatima Sonboli i sar. (2006) MIC za *E. coli* bio viši (11,5 mg mL^{-1}). Slaba aktivnost ove komponente najverovatnije uzrokuje i slabu aktivnost etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* detektovanu protiv *A. baumannii* izolata. Komponenta α -pinen je dominantna komponenta (23,7-76,7 %) testiranih etarskih ulja roda *Juniperus* poreklom sa Balkanskog poluostrva, koja su ispoljila najslabiju aktivnost protiv *A. baumannii* izolata u odnosu na sva ostala testirana etarska ulja (MIC $\geq 4 \mu\text{L mL}^{-1}$). Jasno je da α -pinen kao pojedinačna komponenta poseduje nešto bolju anti-*A. baumannii* aktivnost, nego kao dominantna komponenta etarskih ulja biljaka roda *Juniperus*, koje su kompleksne smeše velikog broja komponenti. Najjaču anti-*Acinetobacter baumannii* aktivnost ispoljio je sabinen (biciklični monoterpenski ugljovodonik) koji je dostigao bakteriostatski efekat pri koncentracijama 856-1290 $\mu\text{g mL}^{-1}$. U prilog tome ide i činjenica da je etarsko ulje vrste *J. foetidissima* koje je ispoljilo najjači efekat u odnosu na ostala ispitivana etarska ulja ovog roda, imalo i najveći sadržaj sabinena (39,9 %) (Lesjak, 2011). Rezultati efekta pojedinačnih biokativnih komponenti na *A. baumannii*, potvrđuju umerenu antibakterijsku aktivnost sabinena, dok dominantna komponenta γ -terpinen nije posedovala ovu aktivnost čak ni pri najvišoj koncentraciji. Ovi rezultati ukazuju da monoterpenski ugljovodonici nisu veoma efikasni kao antimikrobni agensi kada se primenjuju kao pojedinačne komponente, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima drugih *in vitro* studija. Sprovedena je opširna studija u kojoj je pokazano da su komponente etarskih ulja: limonen, α -pinen, β -pinen, δ -3-karen, (+)-sabinen i α -terpinen, ispoljile nisku ili nikakvu antimikrobnu aktivnost protiv 25 različitih rodova bakterija, koje uzrokuju probleme kod životinja, biljaka, kao i kvarenje prehrambenih proizvoda (Dorman i Deans, 2000). Koutsoudaki i sar. (2005) su poredili efekat α -pinena, β -pinena, p-cimena, β -mircena, β -kariofilena, limonena i γ -terpinena protiv bakterijskih vrsta *E. coli*, *S. aureus* i *B. cereus* pri čemu je njihova antimikrobna aktivnost bila veoma niska ili odsutna, a takođe p-cimen i γ -terpinen su bili neefikasni i kao antifungalni agensi protiv *S. cerevisiae* (Rao i sar., 2010). Zanimljivo je napomenuti da je osetljivost *A. baumannii* izolata iz rana na α -pinen bila u direktnoj korelaciji sa stepenom produkcije lektina, što kao i u slučaju etarskih ulja *H. officinalis* i *M. x piperita* ukazuje na ulogu lektina u rezistenciji *A. baumannii* sojeva na ovu bioaktivnu komponentu. Takođe, negativna statistički značajna linearna korelacija je utvrđena između osobine trzajuće pokretljivosti i osetljivosti izolata iz rana na komponentu 3-karen, odnosno sojevi sa izraženijim trzajućim tipom pokretljivosti bili su osetljiviji na ovu komponentu, što ukazuje da 3-karen potencijalno ostvaruje negativan uticaj na pili tipa IV kao površinske strukture bakterijske ćelije genomske vrste *A. baumannii*. Utvrđen bakteriostatski efekat komponente eugenol i sposobnost sojeva da formiraju autoagregate su u statistički značajnoj negativnoj linearnoj korelaciji, kao i u slučaju etarskog ulja *M. communis* (MyK). Dobijeni rezultati anti-*A. baumannii* aktivnosti terpenskih

ugljovodonika, kao i podaci dostupni u literaturi, ukazuju da ove komponente ostavaruju antibakterijski efekat, ali pri veoma visokim koncentracijama s obzirom da se radi o čistim supstancama, zbog čega mogu biti efikasno korišćeni za dezinfekciju abiotičkih površina naročito u bolnicama i ambulancama, ali ne i u *in vivo* tretmanima vrste *A. baumannii*.

Za razliku od terpenskih ugljovodonika, njihovi oksidovani derivati su velika grupa antimikrobnih komponenti koje su aktivne protiv širokog spektra mikroorganizama (Dorman i Deans, 2000). Pretpostavlja se da je antibakterijska aktivnost većine oksidovanih derivata terpenskih komponenti povezana sa njihovim funkcionalnim grupama. Dokazano je da su hidroksilna grupa fenolnih tepenoida i prisustvo delokalizovanih elektrona važni za antimikrobnu aktivnost ovih komponenti (Hyldgaard i sar., 2012). Na primer, detektovana antimikrobna aktivnost derivata karvakrola (karvakrol metil etra i p-cimena) je dosta niža od aktivnosti samog karvakrola (Dorman i Deans, 2000; Ultee i sar., 2002). Zamena hidroksilne grupe karvakrola metil etarskom grupom utiče na njegovu hidrofobnost, antimikrobnu aktivnost i menja način interakcije ovog molekula sa membranom bakterija (Veldhuizen i sar., 2006). Prema dobijenim rezultatima aktivnost oksidovanih derivata terpena protiv *A. baumannii* izolata je bila značajna. Terpinen-4-ol je ispoljio najslabiji antibakterijski efekat ($1189\text{--}2000\ \mu\text{g mL}^{-1}$), dok su timol ($22\text{--}76\ \mu\text{g mL}^{-1}$) i karvakrol ($7\text{--}28\ \mu\text{g mL}^{-1}$) ispoljili najbolji anti-*A. baumannii* efekat, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Montagu i sar. (2014) su takođe protiv multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata (ali poreklom iz krvi) utvrdili aktivnost komponente karvakrol (MIC $310\ \mu\text{g mL}^{-1}$), gde je MIC vrednost bila 10 puta viša u odnosu na ovde dobijenu vrednost za izolate iz rana. Dorman i Deans (2000) su ispitivali efekat oksidovanih derivata terpena protiv 25 različitih bakterijskih sojeva i pokazali da su sve ove komponente, osim borneola i karvakrol metil etra, posedovale antimikrobnu aktivnost protiv velikog broja bakterija. Utvrđeno je da komponente karvakrol, timol i linalol, kao oksidovani derivati terpena, poseduju antimikrobnu aktivnost protiv bakterijskih vrsta *Listeria monocitogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (Dorman i Deans, 2000), dok je protiv vrste *A. baumannii* utvrđen efekat samo za komponente aromadendren ($2\ \text{mg mL}^{-1}$), citronelal ($2\text{--}4\ \text{mg mL}^{-1}$) i (\pm)-citrolelol ($0,125\text{--}0,25\ \text{mg mL}^{-1}$) (Rai i Kon, 2013). Međutim, kao najaktivnije komponente okarakterisane su komponente karvakrol i timol, pri čemu su njihove najviše MIC vrednosti iznosile 300 i $800\ \mu\text{g mL}^{-1}$, redom (Bassolé i sar., 2010). Ove dve komponente su ostvarile najbolji efekat i protiv ovde korišćenih multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana, ali pri značajno nižim koncentracijama (3-8 puta manjim koncentracijama) u odnosu na rezultate studije Bassolé i sar. (2010). Bakteriostatski efekat na sojeve vrste *A. baumannii* je postignut pri koncentracijama $<100\ \mu\text{g mL}^{-1}$, što se može porediti sa efektom konvencionalnih antimikrobnih agenasa. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da su bioaktivne komponente timol i karvakrol potentni i efikasni alternativni antimikrobni agensi protiv multiplo rezistentnih *Acinetobacter baumannii* izolata iz humanog patološkog materijala. Zanimljivo je istaći da je ovde testirano etarsko ulje vrste *S. hortensis* kao glavnu komponentu sadržalo

karvakrol (46,7 %), što je u skladu sa izraženom antibakterijskom aktivnošću ovog etarskog ulja protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata. Takođe, u istom ulju γ -terpinen detektovan takođe u visokom procentu, ali primenjen pojedinačno nije pokazao zadovoljavajuću aktivnost. Ovakvi rezultati predstavljaju još jednu potvrdu antimikrobne aktivnosti komponente karvakrol, kao i da je upravo ova komponenta i/ili njena sinergistička aktivnost sa drugim komponentama prisutnim u etarskom ulju *S. hortensis* odgovorna za anti-*A. baumannii* aktivnost. Slično tome, etarsko ulje vrste *T. vulgaris* za koje je takođe utvrđena značajna antibakterijska aktivnost protiv ove bakterije, kao dominantno zastupljenu komponentu sadrži timol (48,1 %). Dobijeni rezultati aktivnosti oksidovanih derivata terpenskih komponenti etarskih ulja protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva, kao i podaci dostupni u literaturi, ukazuju da ove komponente ostavaruju značajan antibakterijski efekat pri veoma niskim koncentracijama, što ih čini potencijalnim alternativnim agensima za *in vivo* tretman infekcija izazvanih vrstom *A. baumannii*, ali su svakako neophodna detaljnija ispitivanja njihovog mehanizma delovanja.

Od ovde ispitivanih komponenti grupi fenilpropanoidnih komponenti etarskih ulja pripada eugenol. Poređenje molekula koji su hemijski slični eugenolu i izoeugenolu ukazuje da su slobodne hidroksilne grupe važne za njihovu aktivnost protiv bakterija (Hyldgaard i sar., 2012). Zapravo antimikrobna aktivnost fenilpropanoida zavisi od vrste i broja substituenata u aromatičnom prstenu, odabranih sojeva mikroorganizama, eksperimentalnih parametara, kao što je izbor podloge, temperatura itd. (Pauli i Kubeczka, 2010). Prema ovde dobijenim rezultatima, eugenol je ispoljio značajnu antimikrobnu aktivnost protiv Gram negativnih multiplo rezistentnih sojeva. U odnosu na ostale ovde ispitivane bioaktivne komponente etarskih ulja, eugenol je, posle timola i karvakrola, ispoljio najznačajniju anti-*A. baumannii* aktivnost pri koncentracijama 90,5-304,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, što je od tri do deset puta bolja aktivnost od one koju su dobili Laekeman i sar. (1990). Ovi autori su potvrdili aktivnost eugenola i izoeugenola protiv 6 od 10 ispitivanih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija u koncentraciji od 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Montagu i sar. (2014) su takođe protiv multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata iz krvi utvrdili aktivnost komponente eugenol (MIC 1,25 mg mL⁻¹), ali je MIC vrednost bila značajno viša u odnosu na ovde dobijene vrednosti za *A. baumannii* izolate iz rana. Ranije je utvrđena antibakterijska aktivnost eugenola protiv 25 različitih bakterijskih sojeva (9 Gram pozitivnih i 16 Gram negativnih) disk-difuzionom metodom, gde samo rast vrste *Leuconostoc cremoris* nije inhibiran (Dorman i Deans, 2000). Među ispitivanim vrstama u pomenutoj studiji je *A. calcoaceticus* (zona inhibicije eugenola je 15,4 ± 0,3 mm), ali ne i *A. baumannii*. Eugenol je glavna komponenta etarskog ulja karanfilića i njegova antimikrobna aktivnost je povezana sa sposobnošću da permeabilizuje ćelijsku membranu i interaguje sa proteinima. Aktivnost eugenola na bakterijske membrane odvija se najčeće nespecifičnom permeabilizacijom, koja je dokazana u velikom broju studija, detektovana je kao povećan transport kalijuma i ATP-a iz ćelija (Gill i Holley, 2006a). Takođe, u jednoj studiji je dokazano da je eugenol indukovao manje promene u

profilu masnih kiselina kod bakterijskih vrsta *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Brochotrix thermosphacta*, *Salmonella enterica* i *Staphylococcus aureus*, kao i oštećenja ćelija vrsta *Escherichia coli* i *Brochotrix thermosphacta* (Di Pasqua i sar., 2007). Smatra se da se hidroksilna grupa eugenola vezuje i utiče na karakteristike proteina, doprinoseći inhibitornom efektu eugenola u subletalnim koncentracijama. Shodno tome, pokazano je da eugenol inhibira aktivnost enzima kao što su ATPaza, histidin dekarboksilaza, amilaza i proteaza (Gill i Holley, 2006b). Inhibicija enzima ATPaze može biti važna za smrt bakterijskih ćelija pri visokim koncentracijama eugenola, usled oštećenja i smanjenja generisane energije neophodne za oporavak ćelije (Gill i Holley, 2006b). Utvrđena osetljivost *A. baumannii* izolata iz rana na eugenol je bila u statistički značajnoj negativnoj linearnoj korelaciji sa osobinom autoagregativnosti ćelija ($\tau = -1$, $P=0,0$), što kao i u slučaju etarskog ulja MyK ukazuje da su ćelije u formi autoagregata osetljivije na efekat ovog agensa, a objašnjava se efektom agensa na ćelije koje se nalaze na površini autoagregata i posledično izostankom formiranja crveno obojenog formazana nakon dodatka TTC-a.

Prema detektovanoj anti-*A. baumannii* aktivnosti komponente etarskih ulja testirane u ovom radu se mogu hijerarhijski poređati od najaktivnije ka najmanje aktivnoj, prema kriterijumu izračunate geometrijske sredine utvrđenih MIC vrednosti za *A. baumannii* izolate iz rana: karvakrol > timol > eugenol > sabinen > (-)-terpinen-4-ol > α -pinen > (R)-(+)-limonen > 3-karen > α -terpinen, γ -terpinen i terpinolen. Međutim, ovde je bitno istaći da je od strane Organizacije industrijskog razvoja Ujedinjenih Nacija (the United Nations Industrial Development Organization - UNIDO) preporučena *cut-off* vrednost kada je u pitanju primena čistih supstanci, komponenti etarskih ulja i biljnih ekstrakata iznosi 10-12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Dhawan and Srimal, 1998), na osnovu čega je jasno da je samo komponenta karvakrol ispoljila odgovarajuću aktivnost na multiplo rezistentni *A. baumannii* izolat Aba-4156. Dakle, komponenta karvakrol poseduje najbolji bakteriostatski efekat, što je u saglasnosti sa rezultatima klasifikacije etarskih ulja, jer je ulje vrste *O. vulgare* subsp. *hirtum* jedino svrstano u kategoriju etarskih ulja sa veoma izraženom aktivnošću protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata, a sadržalo je karvakrol (71,1 %) kao dominantnu komponentu.

U literaturi postoje podaci o toksičnosti pojedinih ispitivanih jedinjenja. Komponente etarskih ulja čije su LD₅₀ vrednosti za pacova ispod 1 g/kg su karvakrol (810 mg/kg) i timol (980 mg/kg) (Tisserand i Yong, 2014), dok na primer akutna oralna LD₅₀ za α -pinen takođe kod pacova iznosi 3,7 g/kg, a akutna dermalna LD₅₀ kod zečeva iznosi <5 g/kg (Opdyke, 1978). Mirtenil-acetat kao dominantna komponenta etarskog ulja mirte ima utvrđenu akutnu dermalnu LD50 kod zeca i oralnu LD50 kod pacova koje iznose 5 g/kg i 2,6 g/kg, redom (Ford, 1988). Takođe, 1,8-cineol je priznat kao GRAS (eng. *Generally Recognised As Safe*) od strane FEMA (1965) i odobren je od strane FDA (eng. *US Food and Drug Administration*) za primenu u hrani, jer su zaključili da je 1,8-cineol bezbedan za upotrebu u različitim

proizvodima, kao što su na primer pastile koje se uzimaju svakih 0,5-1 h u količini 0,2-15 mg ili svaka 2 h u količini 1-20 mg 1,8-cineola (FDA, 1976-1990). Osim toga, bitno je istaći da utvrđeni efekat bioaktivne komponente može biti pojačan ili smanjen od strane drugih komponenti koje se nalaze u kompleksnim smešama bioaktivnih jedinjenja, poput etarskih ulja i biljnih ekstrakata. Takođe, neke komponente mogu ispoljiti efekte, koje inače ne ispoljavaju kada se ispituju pojedinačno. Iz navedenih razloga, etarsko ulje koje sadrži male količine kancerogenih komponenti, usled prisustva velikih količina komponenti sa antioksidativnom, antimutagenom i antikancerogenom aktivnošću može učiniti ulje bezbednim za upotrebu (Tisserand i Young, 2014).

Na osnovu dobijenih rezultata i literaturnih podataka, jasno je da komponente eugenol, timol i karvakrol predstavljaju potencijalno adekvatno rešenje protiv *A. baumannii* sojeva i potencijalnu alternativu za konvencionalne antimikrobne agense, ali su svakako neophodna dalja ispitivanja u cilju preciznog određivanja mehanizma delovanja ovih biološki aktivnih komponenti, kao i određivanja efekta koji ostvaruju u *iv vivo* uslovima.

6.4.6. MEHANIZAM DELOVANJA ETARSKIH ULJA NA *A. baumannii*

Veliki broj autora se bavi antimikrobnom aktivnošću etarskih ulja, ali mehanizam njihovog delovanja nije dovoljno ispitan. Prema originalnom konceptu postavljenom u literaturi o mehanizmu delovanja etarskih ulja i njihovih bioaktivnih komponenti, pretpostavljeno je da pomenuti agensi generalno deluju na membranske sisteme bakterijskih ćelija. Hidrofobnost je bitna karakteristika etarskih ulja i njihovih komponenti (Sikkema i sar., 1995) koja im omogućava da se akumuliraju u ćelijskim membranama, remeteći njihovu strukturu i uzrokujući povećanje permeabilnosti (Lv i sar., 2011). Oslobođanje intracelularnog sadržaja i remećenje enzimskog sistema ćelija (Lambert, 2002), kao i obiman gubitak ćelijskog sadržaja uzrokuje smrt ćelije (Moreira i sar., 2005). Dobijeni rezultati u ovoj studiji dokazuju da bioaktivne komponente etarskih ulja u stacionarnoj fazi rasta *A. baumannii* inhibiraju i/ili ubijaju ćelije. Poznato je da su bakterijske ćelije u ovoj fazi rasta manje osetljive nego ćelije u eksponencijalnoj fazi (Corre i sar., 1990), što je dokazano i kod ćelija *E. coli* tretiranih etarskim uljem vrste *Melaleuca alternifolia* (Gustafson i sar., 1998). S obzirom da antimikrobni agensi koji utiču na procese ćelijske sinteze često imaju slab efekat na organizme u stacionarnoj fazi rasta (Gilbert, 1984; Russell i sar., 1973), ovi rezultati ukazuju da glavna meta etarskih ulja nisu procesi sinteze makromolekula. Ovo je u saglasnosti i sa rezultatima skeniranja elektronske mikroskopije *A. baumannii* ćelija. Elektronske mikrofografije multiplo rezistentnih netretiranih ćelija kontrolne grupe su prikazale tipičnu morfologiju kokoidnih štapićastih bakterija, pojedinačnih i u parovima. Međutim, elektronske mikrofografije ćelija tretiranih etarskim uljima pri MIC koncentracijama prikazuju očigledne štetne efekte na integritet ćelijskih membrana što uzrokuje povećanje permeabilnosti ćelije. Deformisana morfologija ćelija *A. baumannii* je uočena nakon tretiranja etarskim uljima

vrsta *E. camaldulensis*, *M. communis*, *S. hortensis* i *T. serphyllum*, pri čemu se jasno mogu uočiti mesta na kojima je došlo do rupture na spoljašnjoj membrani. I drugi autori su takođe utvrdili da pojedini antimikrobni agensi uzrokuju velika oštećenja membrana i na taj način dovode do lize bakterijskih ćelija (Denyer i Hugo, 1991; Russell i sar., 1973). Ranije je publikovano da etarska ulja origana, ružinog drveta i timijana poseduju ovaj mehanizam delovanja (Horne i sar., 2001), koji je i ovde potvrđen za analizirana etarska ulja. Osim toga, dobijeni rezultati elektronske mikroskopije tretiranih *A. baumannii* ćelija, sugerišu bakterijske membrane kao ciljno mesto delovanja biološki aktivnih komponenti testiranih etarskih ulja.

Zabeleženo curenje citoplazmatskog sadržaja smatra se indikativnim za ukupno ireverzibilno oštećenje citoplazmatske membrane etarskim uljem (Hugo i Longworth, 1964). Pretpostavlja se da mnoge antimikrobne komponente, koje deluju na citoplazmatsku membranu bakterija (osim već pomenutih komponenti timola i karvakrola), uključujući hlorheksidin (Hugo i Longworth, 1964), heksahlorofen (Joswick i sar., 1971), fenetil alkohol (Silver i Wendt, 1967), polimiksin (Corry i sar., 1977), α -pinen (Andrews i sar., 1980) i ulje limunove trave (Onawunmi i Ogunlana, 1985) dovode do curenja ćelijskog sadržaja. Carson i sar. (2002) su pretpostavili da suspenzije *S. aureus* tretirane etarskim uljem *Melaleuca alternifolia* ili njegovim komponentama (1,8-cineol, terpinen-4-ol i α -terpineol) dovode do gubitka nukleinskih kiselina kroz oštećenu citoplazmatsku membranu. Dobijeni rezultati ukazuju na gubitak i oslobađanje proteina, ugljenih hidrata i lipida u velikoj količini iz *A. baumannii* ćelija tretiranih etarskim uljima. Etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* koja su ispoljila značajan antimikrobni efekat, nisu uzrokovala najveće oslobađanje ni jedne od pomenutih komponenti bakterijskih ćelija, međutim količina oslobođenih ćelijskih proteina, ugljenih hidrata i lipida nije bila zanemarljiva, za razliku od ostalih etarskih ulja čiji je efekat i količina oslobođenog materijala varirala.

Koncentracije etarskih ulja koje su najčešće dovele do oslobađanja proteina, ugljenih hidrata i lipida iz ćelija *A. baumannii* bile su $1/2 \times \text{MIC}$, MIC i $2 \times \text{MIC}$, međutim u nekim slučajevima čak i pri koncentracijama $1/8 \times \text{MIC}$ i $1/4 \times \text{MIC}$, zabeleženo je značajno oslobađanje ćelijskog sadržaja. Ove subletalne koncentracije etarskih ulja takođe mogu izmeniti propustljivost membrana i uticati na gubitak sposobnosti adekvatne osmoregulacije ćelije i/ili izbacivanja toksičnih agenasa iz ćelije (Gilbert, 1984). Ovakve pretpostavke se mogu odnositi i na ovde utvrđeni efekat sub-inhibitornih koncentracija na ćelije *A. baumannii*. Takođe, prema dobijenim rezultatima stepen oslobođenih biomolekula se povećavao sa povećanjem primenjene koncentracije etarskog ulja. Neki autori sugerišu da usled oštećenja membrane dolazi i do oslobađanja autolitičkih enzima ćelijskog zida vezanih za membranu, što na kraju dovodi do lize ćelija (Gilbert, 1984). Osim toga, do lize može dovesti i slabljenje ćelijskog zida i naknadno pucanje citoplazmatske membrane usled osmotskog pritiska, a ne kao posledica specifične aktivnosti ulja. Na osnovu dobijenih

rezultata jasno je da ispitivana ulja deluju na ćelije prvenstveno, tako što oštećuju membranske sisteme i uzrokuju oslobađanje biomolekula iz ćelije.

Interakcije sa hidrofobnim strukturama bakterijske ćelije igraju ključnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti ugljovodonika (Sikkema i sar., 1995), u ovom konkretnom slučaju ugljovodoničnih komponenti testiranih etarskih ulja. Shodno tome, pretpostavke koje se tiču mehanizma delovanja etarskih ulja su bazirane na prirodi ovih komponenti. Prilikom ranijih ispitivanja mehanizama delovanja lipofilnih biocida dokazan je efekat na citoplazmatsku membranu i/ili enzime ugrađene u membranu (Andrews i sar., 1980; Sikkema i sar., 1994; Sikkema i sar., 1992). Međutim, ostaje mogućnost da postoje i druga mesta delovanja, osim citoplazmatske membrane. Takođe, moguće je da neke komponente, koje do sada nisu ispitivane, doprinose antimikrobnoj aktivnosti ulja nekim drugim mehanizmima. Uzimajući u obzir heterogeni sastav testiranih etarskih ulja i antimikrobnu aktivnost mnogih njihovih komponenti, najverovatnije je da ne postoji samo jedan mehanizam delovanja ili da nije samo jedna komponenta odgovorna za antimikrobnu aktivnost. Neophodna su dalja *in vitro* i *in vivo* istraživanja na ovu temu kako bi u potpunosti razumeli mehanizme uključene u antimikrobne efekte etarskih ulja.

U ovom istraživanju analiziran je i efekat etarskih ulja na proteinski profil dobijen SDS-PAGE metodom *A. baumannii* sojeva, da bi se utvrdio efekat ulja na ekspresiju pojedinih proteina. Dva etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camadulensis* su korišćena za utvrđivanje ovog efekta. Ova ulja su uticala na oslobađanje proteina iz ćelija u koncentracijama $1/2 \times \text{MIC}$, MIC i $2 \times \text{MIC}$, iz tog razloga su za tretman prilikom utvrđivanja efekta ulja na proteinski profil *A. baumannii* sojeva odabrane niže koncentracije, odnosno $1/4 \times \text{MIC}$ i $1/8 \times \text{MIC}$. Felső i sar. (2013) su pretpostavili da etarska ulja cimeta i karanfilića mogu uticati na proteine spoljašnje membrane kod sojeva roda *Pseudomonas*. Naime, nakon tretmana etarskim uljem karanfilića i etarskim uljem cimeta u koncentraciji $0,5 \times \text{MIC}$ i $2 \times \text{MIC}$ u toku 60 minuta, primenom SDS-PAGE elektorforeze ovi autotri su utvrdili nestanak proteina molekulske mase 79,4 kDa i 42,7 kDa, tj. sprečena je njihova ekspresija. Proteinski profil četiri *A. baumannii* izolata iz rana (Aba-4914, Aba-4156, Aba-4803 i Aba-8833) je pokazao prisustvo 39 jasnih traka na SDS-PAGE gelu. Razlike u ekspresiji proteina između tretiranih i netretiranih ćelija jednog soja nisu detektovane, dok su razlike između proteinskih profila *A. baumannii* sojeva bile jasno uočljive. Kod Aba-4914 soja, okarakterisanog kao rezistentniji na etarsko ulje vrste *M. communis*, detektovano je prisustvo proteina veličine oko 29 kDa i 42 kDa, koje soj osetljiviji na ovo etarsko ulje nije ekspimirao, kao ni preostala dva analizirana soja ove vrste. Soj Aba-4803 (osetljivi na primenjeno etarsko ulje) ekspimirao je tri proteina od oko 39, 41 i 49 kDa, a koji nisu detektovani u proteinskom profilu ostalih sojeva. Bitno je istaći da je razlika u veličini proteina kod sojeva Aba-4914 (42 kDa) i Aba-4803 (41 kDa) veoma mala, a primenjena metoda ne omogućava preciznu identifikaciju proteina, zbog čega je potrebna detaljnija analiza 2D elektorforezom i potom sekvenciranjem aminokiselina. Na osnovu procenjene veličine proteina detektovanih kod soja Aba-4803 može se pretpostaviti

da pripadaju grupi penicilin-vezujućih proteina, gde spada i protein veličine 28 kDa detektovan kod Aba-8833 (Vashist i sar., 2011). Multiplo rezistentni soj Aba-4156 je u svom proteinskom profilu ekspimirao tri proteina 19, 29 i 48 kDa, od kojih je protein veličine 29 kDa detektovan i kod soja Aba-4914, a za koji se pretpostavlja da je protein CarO veličine 29 kDa koji je poznat porin spoljašnje membrane *A. baumannii*. *A. baumannii* soj Aba-8833 je ekspimirao čak četiri proteina koji nisu detektovani kod ostalih testiranih sojeva (28, 33, 76 i 128 kDa). Prema ovde dobijenim rezultatima, nije utvrđena značajna razlika u ekspresiji vidljivih proteina kod sojeva otpornijih na testirana etarska ulja (Aba-4914 i Aba-4156), kao ni kod soja Aba-4803 osetljivijeg na tretman etarskim uljima *M. communis* i *E. camadulensis*, odnosno proteinski profil netretirane i tretirane serije izgledao je isto, bez pojave ili gubitka proteinskih traka. Međutim, kod soja Aba-8833 nakon tretmana etarskim uljem *E. camaldulensis* detektovano je blago pojačanje intenziteta ekspresije proteina većine 33 kDa u odnosu na stepen njegove ekspresije bez tretmana etarskim uljem, koji bi prema molekulskoj masi mogao biti molekularni čaperon. Imajući u vidu da je tretman etarskim uljem *E. camaldulensis* uslovio pojačanu ekspresiju ovog proteina, može se pretpostaviti njegova uloga u zaštiti bakterijskih membrana. Takođe, uočena je smanjena ekspresija svih ostalih proteina u tretiranim serijama, koje se ogleda u gubitku intenziteta obojenosti traka na gelu obrnuto zavisno od primenjene koncentracije agensa, što takođe može biti posledica smanjenja brojnosti ćelija pod uticajem bakteriostatskog i/ili baktericidnog efekta etarskog ulja. Međutim, utvrđena je razlika u proteinskim profilima četiri analizirana *A. baumannii* soja, od kojih su sojevi Aba-4803 i Aba-8833 okarakterisani kao osetljiviji na etarska ulja i antibiotike, dok su druga dva soja Aba-4914 i Aba-4156 okarakterisana kao rezistentniji. Bitno je istaći da su analizirani sojevi u logaritamskoj fazi rasta, jer je poznato da su ćelije u ovoj fazi najosetljivije na faktore stresa, što je verovatno posledica formiranja peptidoglikanskog omotača u ovoj fazi, a osim toga metabolički procesi su u ovoj fazi intenzivniji, tako da je efekat pomenutih faktora izraženiji (Lv i sar., 2011). Detektovane kvantitativne promene u proteinskom profilu *A. baumannii* mogu doprineti objašnjenju antibakterijskog efekta etarskih ulja vrsta *M. communis* i *E. camadulensis* protiv multiplo rezistentnih sojeva ove vrste. Međutim, neophodna su dalja ispitivanja u smislu razdvajanja proteina 2D elektroforezom, kao i sekvenciranje proteina od 33 kDa, da bi se izveli definitivni zaključci.

Rezultati skening elektronske mikroskopije, utvrđen stepen oslobođenih proteina, ugljenih hidrata i lipida, kao i efekat etarskih ulja na proteinski profil *A. baumannii* ukazuju na činjenicu da je glavni mehanizam delovanja ispitivanih etarskih ulja narušavanje integriteta membranskih sistema bakterijske vrste *A. baumannii*.

6.5. EFEKAT KOMBINACIJE ANTIMIKROBNIH AGENASA NA *A. baumannii*

Uzimajući u obzir porast antibiotske rezistencije na hemijski sintetisane agense, koji imaju neželjena dejstva i ispoljavaju toksičan efekt, etarska ulja prirodnog porekla pokazuju značajnu i obećavajuću aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata. Sa ciljem redukcije minimalne efektivne doze antibiotika i samim tim smanjenja potencijanih neželjenih efekata i toksičnosti antibiotika, kao i sprečavanja širenja antibiotske rezistencije tokom monoterapije, ispitan je efekat kombinacije konvencionalnih antibiotika sa etarskim uljima protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata. Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje sinergističkog efekta ciprofloksacina i polimiksina B u kombinaciji sa etarskim uljima vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* protiv tri izolata rezistentnih na ove antibiotike kada se primenjuju pojedinačno. Sinergistički efekat ove kombinacije antibiotika i etarskih ulja zavisio je od samog soja, ali i načina delovanja antibiotika i etarskog ulja pojedinačno. Naime, polimiksin B i ciprofloksacin pripadaju različitim klasama antibiotika i shodno tome poseduju različit način delovanja. Ciprofloksacin inhibira replikaciju DNK delujući na DNK girazu (Zhao i sar., 1997), dok polimiksin B remeti membranske strukture (Tam i sar., 2005). Kao što je i u prethodnom poglavlju potvrđeno, mehanizam delovanja etarskih ulja se uglavnom sastoji u narušavanju strukture membrana i menjanju njihove propustljivosti, što dovodi do oslobađanja intracelularnog sadržaja iz ćelija (Amensour i sar., 2010; Bakkali i sar., 2008). Upravo zbog ovakvog mehanizma delovanja, koji pogađa membrane bakterijske ćelije, koje su barijera za antimikrobne agense, etarska ulja svojom aktivnošću najverovatnije prave otvoren put za antibiotike, olakšavajući njihov ulazak u ćeliju i tako povećavaju njihovu aktivnost. Na ovaj način se može objasniti da je kombinacija etarskih ulja mirte i eukaliptusa sa ciprofloksacinom najčešće rezultovala sinergističkom aktivnošću protiv tri multiplo rezistentna *A. baumannii* izolata iz rana u koncentracijama $1/4 \times \text{MIC}$ antibiotika (MIC_{AB}) i $1/8 \times \text{MIC}$ etarskog ulja (MIC_{EU}). Delujući na različitim ćelijskim nivoima, kombinacije antibiotika i etarskih ulja povećavaju osetljivost multiplo rezistentnih *A. baumannii* ćelija na konvencionalne antibiotike, tj. smanjuju efikasne koncentracije antibiotika. Međutim, i pored dokazanog sinergizma, ova kombinacija nije bila dovoljno efikasna, zato što MIC vrednost ciprofloksacina nije značajno redukovana u kombinaciji, odnosno MIC vrednost nije redukovana do ili ispod terapeutske granične koncentracije (*cut-off* vrednosti) ovog antibiotika za osetljivost *A. baumannii* sojeva. Nasuprot tome, kombinacija etarskih ulja mirte i eukaliptusa sa polimiksinom B je bila efikasnija, najverovatnije zbog sličnog načina delovanja ova dva antimikrobna agensa i istog ciljnog mesta delovanja. Ovo dovodi u pitanje tvrdnju Hyldgaard i sar. (2012) da se antagonizam javlja kao posledica istog mesta delovanja antimikrobnih agenasa. Ovakva tvrdnja je verovatno u redu kada se radi o kompeticiji agenasa za isto ciljno mesto (npr. vezivanje za protein DNK girazu), međutim u slučaju polimiksina B i ovde testiranih etarskih ulja radi se o destrukciji određenih struktura,

odnosno membrana, te stoga međusobne interakcije ovih agenasa mogu dovesti do sinergizma. Mehanizam delovanja polimiksina B, koji se pokazao kao najefikasniji agens kada je primenjen pojedinačno, razlikuje se u odnosu na sve ostale ispitivane antibiotike, što ukazuje da bi membranske strukture bakterijske ćelije trebalo da budu ciljna mesta multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva na koja treba delovati u cilju eradikacije njihovih prezistentnih infekcija. Kombinacija sa etarskim uljem mirte u koncentraciji $1/4 \times \text{MIC}$ dala je sinergistički efekat redukujući MIC vrednost polimiksina B čak 4 puta (do $1/4 \times \text{MIC}$ za antibiotik), čineći *A. baumannii* soj Aba-4914 osetljivim na ovaj antibiotik.

Sinergizam fluorohinolona sa etarskim uljima je ranije potvrđen za *Pelargonium graveolens* (Rosato i sar., 2007), što je u sagalsnosti sa ovde dobijenim rezultatima za etarska ulja vrsta *Myrtus communis* i *Eucalyptus camaldulensis*. Međutim, sinergistička aktivnost etarskih ulja i polimiksina B je po prvi put detektovana. Ova kombinacija redukuje koncentracije oba agensa i čak čini multiplo rezistentne sojeve ponovo osetljivim, najverovatnije zato što su MIC vrednosti za polimiksin B bile bliže *cut-off* vrednosti (MIC je $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, a *cut-off* vrednost $2 \mu\text{g mL}^{-1}$), nego detektovane MIC vrednosti za ciprofloksacin (MIC je $32\text{-}64 \mu\text{g mL}^{-1}$, a *cut-off* vrednost $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Radi provere i potvrde rezultata dobijenih preračunavanjem FICI za polimiksin B, koji su ukazali na sinergizam, odabrana su dva soja za ispitivanje efekta kombinacije etarskih ulja mirte i eukaliptusa sa polimiksinom B u toku vremena protiv multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata iz rane Aba-4914 i referentnog soja ATCC 19606. Dobijeni antibakterijski efekat kombinacije je potvrđen kinetikom inhibicije, pri čemu je brojnost *A. baumannii* nakon 24 h inkubacije redukovana za više od 4 log u poređenju sa efektom polimiksina B, kao pojedinačnog aktivnijeg agensa. Osim toga, ova kombinacija agenasa je u koncentraciji $1/4 \times \text{MIC}_{\text{EU}}$ ($0,5\text{-}1 \mu\text{L mL}^{-1}$) i $1/4 \times \text{MIC}_{\text{AB}}$ ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) protiv multiplo rezistentnog izolata iz rane rezultirala veoma efikasnim sinergizmom, redukujući brojnost ćelija do granice detekcije nakon samo 6 h inkubacije. Zanimljivo je istaći da $1/4 \times \text{MIC}_{\text{EU}}$ nije redukovala brojnost bakterija, a na grafikonima se jasno može uočiti da $1/4 \times \text{MIC}$ za polimiksin B ubrzano redukuje brojnost bakterija u toku kratkog vremenskog perioda, koje je kasnije praćeno ponovnim gradacijskim porastom, što ima za rezultat visoku bakterijsku brojnost nakon produžene inkubacije. Ovaj fenomen nije ranije detektovan za ovaj antibiotik (Qian i sar., 2012). Međutim, kada je polimiksin B kombinovan sa etarskim uljima, ponovni rast je samo privremen ili odsutan, što rezultuje značajnom finalnom redukcijom bakterijske brojnosti nakon 24 h.

Imajući u vidu da poslednjih godina postoji povećan interes za upotrebu prirodnih antimikrobnih agenasa, primena ovih kombinacija predstavlja značajnu strategiju za kontrolu patogenih bakterija. U praksi, znanje potrebno za korišćenje sinergističkih kombinacija sa etarskim uljima je: (1) ciljno mesto i način delovanja svih komponenti etarskih ulja, (2) mehanizam koji rezultuje sinergizmom ili antagonizmom između nekoliko komponenti, (3) potencijalna toksičnost kombinovanih etarskih ulja ili komponenti, i (4) kako svaka komponenta stupa u interakciju sa sistemom u kome se nalazi (npr. matriks hrane, živi

sistem, oragnizam, hemijska formulacija, itd.) u smislu načina na koji taj sistem utiče na antimikrobne karakteristike komponenti pojedinačno i u kombinaciji (Hyldgaard i sar., 2012). Kada se detalji mehanizma sinergističkih interakcija budu bolje razumeli, biće lakše iskoristiti sinergizam za borbu protiv mikroorganizama.

Danas postoje razne antimikrobne masti protiv infekcija rana i čini se da su najefikasnije protiv *A. baumannii* upravo one koje sadrže kombinacije antimikrobnih agenasa, npr. bacitracina i polimiksina B (Geronemus i sar., 1979; Cooper i sar., 1991). Slična formulacija je korišćena kao krema za ortopedske hiruške rane u cilju prevencije infekcija – kombinacija 50 000 U bacitracina i 50 mg/l polimiksina B u sterilnom fiziološkom rastvoru ili mlečnom Ringerovom rastvoru (Rosemberg i sar., 2008). Osim ove dvostruke antibiotske masti i kreme, ponekad se neomicin koristi u kombinaciji sa polimiksinom i/ili bacitracinom. Međutim, zbog činjenice da neomicin uzrokuje kontaktni dermatitis, tj. alergijske reakcije kod nekih pacijenata, isključen je iz ove kombinovane masti (Fletcher i sar., 2007; Dirschl i Wilson, 1991). Prema dobijenim rezultatima, dalja ispitivanja bi trebalo sprovesti *ex vivo* efekat kombinacije etarskih ulja mirte i eukaliptusa u kombinaciji sa polimiksinom B, kao aktivnih komponenti masti ili kreme za površinske rane.

Kako novi antibiotici protiv multiplo rezistentnih bakterija, uključujući i *A. baumannii* izolate iz rana, neće biti dostupni u narednih nekoliko godina, dobijeni rezultati za etarska ulja i njihove komponente čine ih značajnim potencijanim alternativnim agensima, dok njihove kombinacije sa trenutno dostupnim konvencionalnim antimikrobnim agensima predstavljaju novu strategiju u terapiji koja obećava. U skladu sa tim, etarska ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* mogu biti uključena u formulacije nekih komercijalnih hemijskih proizvoda za higijenu, kao što su sanitarni agensi, u cilju redukcije brojnosti i sprečavanja širenja multiplo rezistentnih sojeva. Međutim, dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja etarskih ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* su neophodna pre nego što njihova primena kao novih komercijalnih i terapijskih agenasa bude odobrena.

Pored kombinovanja antibiotika i etarskih ulja, ispitana je i mogućnost kombinovanja antibiotika i pojedinačnih komponenti zastupljenih u korišćenim uljima. Fenomen multiple rezistencije je doveo do razvoja kombinovane terapije konvencionalnih agenasa, koja je vremenom postala uobičajena u praksi. Mnoga istraživanja potvrdila su *in vitro* sinergistički efekat kombinacije antibiotika protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* sojeva. Tako na primer, sinergizam je dokazan kada je kombinovan ampicilin-sulbaktam sa karbapenemom, kao i između meropenema i polimiksina B (Özseven i sar., 2012; Pankey i Ashcraft, 2009). Ovakav kombinovani tretman prolongira urgentnost za pronalaženjem drugih načina za tretman *A. buamannii* infekcija, ali i dalje postoji potreba za pronalaženjem adekvatnih alternativnih rešenja. Iz tog razloga neki autori su testirali kombinacije konvencionalnih antibiotika i nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa, kao što su biljni ekstrakti (Basri i Khairon, 2012), etarska ulja (Rosato i sar., 2007) i bakteriofagi (Knezevic i sar., 2013). Kao što je naglašeno, kombinacije agenasa redukuju minimalnu efektivnu dozu antibiotika i na taj

način smanjuju potencijalne neželjene efekte antibiotika i/ili sprečavaju širenje antibiotske rezistencije tokom monoterapije. Iz tog razloga, kao i zbog detektovanih sinergističkih interakcija u kombinacijama etarskih ulja sa antibioticima, ovde je testirana i efikasnost kombinacija komponenti etarskih ulja (timol, karvakrol i eugenol) i konvencionalnih antibiotika (ciprofloksacin, polimiksin B i gentamicin). Kao najefikasnije kombinacije pomenutih antimikrobnih agenasa pokazale su se kombinacije bioaktivnih komponenti timol, karvakrol i eugenol sa ciprofloksacinom i to protiv referentnog soja, ali i multiplo rezistentnog izolata iz rane. Hemaiswarya i Double (2010) su u svojoj studiji kombinovali ciprofloksacin sa *trans*-cimetnom kiselinom protiv vrsta *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* i *S. aureus* koja je rezultovala sinergističkom interakcijom. Kombinacija ciprofloksacina sa pomenutim komponentama etarskih ulja je po prvi put testirana protiv bakterijske vrste *A. baumannii* i pokazala se kao efikasna. Kombinacije ciprofloksacina sa bioaktivnim komponentama ostvarile su sinergistički efekat protiv referentnog soja (FICI=0,1-0,4), kao i multiplo rezistentnog *A. baumannii* izolata (FICI=0,3-0,5). U sinergističkim kombinacijama za oba testirana *A. baumannii* soja smanjene su MIC vrednosti bioaktivnih komponenti etarskih ulja na $1/4 \times \text{MIC}$ - $1/16 \times \text{MIC}$, ali i ciprofloksacina za $1/4 \times \text{MIC}$ ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ za referentni soj, $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ za multiplo referentni soj). Međutim, iako je utvrđen sinergistički efekat, MIC vrednost za ciprofloksacin multiplo rezistentnog izolata u kombinaciji sa bioaktivnim komponentama nije snižena do nivoa bakterijske osetljivosti, koja za ovaj antibiotik iznosi $\leq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ za vrstu *A. baumannii* (Peleg i sar., 2008). Kombinacije drugog testiranog antibiotika, gentamicina (u koncentraciji $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $1/4 \times \text{MIC}$) sa komponentama karvakrol i eugenol ($1/4 \times \text{MIC}$ i $1/8 \times \text{MIC}$) su protiv referentnog soja ostvarile sinergistički efekat (FICI=0,4-0,5), a sa komponentom timol detektovan je granični sinergistički do aditivan efekat (FICI=0,5-0,8). U ovim kombinacijama, MIC vrednost za referentni soj je smanjena do utvrđene granice osetljivosti za *A. baumannii* sojeve ($\leq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Peleg i sar., 2008). Protiv multiplo rezistentnog soja detektovan je indiferentan efekat (FICI=1,1-1,5) u kombinaciji gentamicina (u koncentracijama $\leq 128 \mu\text{g mL}^{-1}$) sa karvakrolom i timolom ($1/2 \times \text{MIC}$), dok kombinacija gentamicin-eugenol nije uticala na inhibiciju rasta multiplo rezistentnog izolata Aba-4914 ni pri jednoj od testiranih koncentracija agenasa u kombinaciji, iako je eugenol kada je testiran pojedinačno ostvario bolji bakteriostatski efekat u poređenju sa komponentom timol. Odsustvo antibakterijskog efekta ovih agenasa u kombinaciji je najverovatnije posledica antagonističkih interakcija gentamicina i eugenola. Kao i u slučaju ciprofloksacina, u kombinacijama komponenti etarskih ulja sa gentamicinom koje su okarakterisane kao indiferentne protiv multiplo rezistentnog izolata, MIC vrednosti nisu snižene dovoljno (sa $>256 \mu\text{g mL}^{-1}$ na $16-32 \mu\text{g mL}^{-1}$), odnosno do granice osetljivosti za ovaj antibiotik koja iznosi $\leq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ za vrstu *A. baumannii* (Peleg i sar., 2008). Gentamicin je i ranije kombinovan sa eugenolom, ali ne protiv vrste *A. baumannii*, i detektovani su sinergistički ili aditivni efekti (Moon i sar., 2011), dok su drugi autori takođe detektovali sinergističke ili aditivne interakcije ovog antibiotika sa timolom i to protiv *S.*

aureus i *P. aeruginosa* (Veras i sar., 2012). Ovakvi rezultati koji variraju od sinergističkog do antagonističkog efekta, ukazuju na zavisnost tipa interakcija između agenasa od testirane bakterijske vrste, kao i bakterijskog soja, ali i bioaktivne komponente koja se kombinuje sa određenim antibiotikom, u ovom slučaju sa gentamicinom. Za razliku od kombinacija ciprofloksacina i gentamicina, kada je testiran efekat kombinacije konvencionalnog agensa, polimiksina B ($1/2 \times \text{MIC}$, odnosno $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ za referentni soj, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ za multiplo rezistentni soj) sa bioaktivnim komponentama ($1/2 \times \text{MIC}$ i $1 \times \text{MIC}$) protiv *A. baumannii*, detektovane interakcije su okarakterisane kao indiferentne ($\text{FICI}=1,0-1,5$). Međutim, i pored toga što kombinacija nije rezultovala sinergizmom, u kombinacijama je snižena efektivna koncentracija antibiotika tako da je multiplo rezistentni soj Aba-4914 postao osetljiv (*cut-off* vrednost $\leq 2 \mu\text{g mL}^{-1}$) na polimiksin B. Na osnovu toga može se pretpostaviti da osim tipa interakcije između agenasa koji se kombinuju, njihov ukupan efekat zavisi od stepena rezistencije *A. baumannii* na testirani antibiotik, odnosno od visine utvrđenih vrednosti MIC i udaljenosti ove koncentracije od terapijskih doza. Hemaiswarya i Double (2009) su takođe testirali kombinaciju polimiksina i eugenola, ali one su okarakterisane kao sinergističke i to protiv Gram negativnih bakterija *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* i *S. Thypimurium*. Prema ovde dobijenim rezultatima, sinergističke interakcije su potvrđene za kombinacije ciprofloksacina sa svim bioaktivnim komponentama protiv oba *A. baumannii* izolata, kao i za kombinacije gentamicina takođe sa sve tri testirane bioaktivne komponente, ali samo protiv referentnog soja. Detektovane sinergističke interakcije se mogu objasniti pretpostavkom Palaniappan i Holley (2010) da je mehanizam odgovoran za sinergizam povećan ulaz antibiotika preko permeabilisanih membrana i/ili inhibicije zaštitnih enzima. Osim toga, relativno male razlike u hemijskoj strukturi komponenti etarskih ulja ostvaruju značajan efekat na sposobnost svake pojedinačne komponente da se udruži i ostvari sinergističko delovanje sa antibioticima. Inicijalne indicije o mehanizmu delovanja ovih komponenti predstavlja primer za timol i karvakrol, koji je naveden u opštem delu, kao i primer za cinamil-aldehid koji poseduje dve prop-2-enal sporedne grupe u benzenovom prstenu, a koji je ostvario sinergizam sa manje antibiotika nego fenolne komponente karvakrol i timol (Zhang i sar., 2011; Palaniappan i Holley, 2010). Naime, većina studija koje se bave interakcijama između pojedinačnih komponenti etarskih ulja i antibiotika utvrđuje postojanje *in vitro* sinergizma, pri čemu sam mehanizam njihovog delovanja ostaje nepoznat. Imajući u vidu da mnoge bioaktivne komponente etarskih ulja ostvaruju perturbacione efekte na membrane mikroorganizama (Ultee i sar., 2002), a većina antibiotika poseduje specifična ciljna mesta u sintetskim procesima (sinteze ćelijskog zida, proteina ili nukleinskih kiselina), čini se da sinergizam u najvećem broju slučajeva posledica multi-targetnog efekta (Langeveld i sar., 2014). Međutim, postoje pretpostavke da sinergizam između antibiotika i bioaktivnih komponenti etarskih ulja utiče na mehanizme bakterijske rezistencije, posebno inhibirajući efluksne pumpe (Lorenz i sar., 2009; Shahverdi i sar., 2007).

Etarska ulja kao kompleksne mešavine isparljivih komponenti, koje nastaju kao rezultat biosintetskih procesa sekundarnog metabolizma biljaka, mogu se svrstati u dve biosintetski povezane grupe (Pichersky i sar., 2006). Obe grupe obuhvataju isparljive komponente, koje karakteriše mala molekulska masa, pri čemu jedna grupa obuhvata niže, isparljive terpenoide, a druga aromatične i alifatične komponente. Rezultati nekih studija su potvrdili da veliki broj ovih komponenti, kada su testirane pojedinačno, poseduje značajna antimikrobna svojstva (Juliani i sar., 2002), što takođe potvrđuju i ovde dobijeni rezultati anti-*A. baumannii* aktivnosti pojedinačnih bioaktivnih komponenti etarskih ulja. U nekim slučajevima bioaktivnost etarskih ulja je blisko povezana sa aktivnošću dominantnih komponenti ulja (Juliani i sar., 2002). Međutim, mnoga istraživanja su pokazala da je antimikrobna aktivnost mnogo veća kada se koriste etarska ulja, tj. smeše ovih jedinjenja, što je upravo rezultat kompleksnih interakcija između različitih klasa komponenti, kao što su fenoli, aldehidi, ketoni, alkoholi, estri, etri ili ugljovodonici, koje su detektuju u etarskom ulju (Burt, 2004; Lambert i sar., 2001). Ove interakcije mogu imati antagonistički, indiferentan, aditivan ili sinergistički efekat. Uglavnom kombinacije bioaktivnih komponenti u etarskom ulju i/ili veštački pripremljene mešavine prečišćenih komponenti, utiču na višestruke biohemijske procese kod bakterija, proizvodeći veliki broj različitih interaktivnih antimikrobnih efekata (Delaquis i sar., 2002; Harris, 2003). Mnoge studije ukazuju da etarska ulja poseduju veću antimikrobnu aktivnost nego veštačke mešavine njihovih dominantnih komponenti, što navodi na zaključak da su komponente koje su u manjoj količini zastupljene u etarskom ulju igraju veoma značajnu ulogu u interakcijama između komponenti (Davidson i Parish, 1989; Mourey i Canillac, 2002). Ovakva pretpostavka je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima, jer je sinergistički efekat najefikasnijih bioaktivnih komponenti protiv *A. baumannii* referentnog soja potvrđen samo za kombinacije timol-eugenol i timol-karvakrol, a isti efekat kombinacije timol-karvakrol ranije je potvrđen za vrstu *E. coli* (Pei i sar., 2009). Pei i sar. (2009) su kombinaciju karvakrol-eugenol okarakterisali kao sinergističku protiv *E. coli*, dok je prema rezultatima Gallucci i sar. (2009) ova kombinacija protiv *S. aureus*, *B. cereus* i *E. coli* ostvarila antagonistički efekat. Prema ovde dobijenim rezultatima, ostale testirane binarne kombinacije bioaktivnih komponenti (timol-sabinen, eugenol-karvakrol, eugenol-sabinen i karvakrol-sabinen) su protiv *A. baumannii* ispoljile aditivan ili indiferentan efekat. Rezultati ranijih ispitivanja su pokazali da kombinacija timol-karvakrol može imati aditivan, sinergistički ili antagonistički efekat protiv vrsta *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus* i *S. Typhimurium* (Lambert i sar., 2001; Pei i sar., 2009; Gallucci i sar., 2009; Zhou i sar., 2007). Ovakvi rezultati su međusobno u suprotnosti i otežavaju pronalaženje adekvatnih kombinacija. Iz tog razloga potrebno je usmeriti istraživanja na jedan standardizovan metod za utvrđivanje efekta kombinacije antimikrobnih agenasa, koji je odabran kao najefikasniji i najrelevantiji metod u ove svrhe. Većina studija se fokusira na interakciju fenolnih monoterpena (timol, karvakrol) i fenilpropanoide (eugenol) koje su ovde ispitivane, ali i sa ostalim grupama komponenti, naročito sa drugim fenolnim komponentama,

fenilpropanoidima i monoterpenskim alkoholima, dok se monoterpenski i seskviterpenski ugljovodonici manje koriste u ispitivanjima (Pei i sar., 2009; Lambert i sar., 2001; Ultee i sar., 2002; Zhou i sar., 2007). Kombinacija fenolnih komponenti sa komponentama iz grupe monoterpenskih alkohola rezultovala je sinergističkim efektom protiv *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocitogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Bassolé i Juliani, 2012). Ovi autori su slično rezultatima dobijenim za *A. baumannii* sojeve, kombinaciju timola sa karvakrolom, kao i kombinaciju timola, karvakrola i eugenola, okarakterisali kao sinergističku protiv sojeva vrsta *E. coli* i *S. Typhimurium* (Bassolé i Juliani, 2012). Takođe, rezultati ostalih testiranih kombinacija bioaktivnih komponenti protiv *A. baumannii* su u saglasnosti sa drugim studijama, jer su detektovani i aditivni i antagonistički efekti (Lambert i sar., 2001; Gallucci i sar., 2009). Kao i prema ovde dobijenim rezultatima za *A. baumannii*, većina studija opisuje aditivan ili sinergistički efekat fenolnih i alkoholnih jedinjenja, pri čemu se može uočiti da su generalno komponente slične hemijske strukture češće ispoljavale aditivan nego sinergistički efekat. Česta pojava aditivnog tipa interakcija nekih komponenti etarskih ulja se uglavnom dovodi u vezu sa fenolnim jedinjenjima (karvakrol i timol) (Lambert i sar., 2001), dok se antagonistički efekat pripisuje interakcijama između neoksidovanih i oksidovanih ugljovodonika (Bassolé i Juliani, 2012).

Trenutno se malo zna o mehanizmima koji rukovode sinergizmom i antagonizmom među komponentama etarskih ulja, ali postoji četiri pretpostavljena teorijska mehanizma antimikrobnih interakcija bioaktivnih komponenti etarskih ulja koje rezultuju sinergizmom: (1) uzastopna inhibicija nekoliko koraka u određenom biohemijskom putu, (2) inhibicija enzima koji razgrađuju ili pumpi koje izbacuju antimikrobne agense, (3) interakcija nekoliko antimikrobnih agenasa sa ćelijskim zidom, (4) interakcija sa ćelijskim zidom ili membranom, koja vodi povećanom usvajanju drugih antimikrobnih agenasa (Hyldgaard i sar., 2012). Druga mogućnost ostvarivanja sinergističkih efekata komponenti je ta da antimikrobni agensi imaju različite mehanizme delovanja i pogađaju dva različita mesta ili metabolička puta na ili u ćeliji, koji indirektno zavise jedan od drugog. O uzroku javljanja antagonizma se još manje zna, ali se pretpostavlja da se dešava kada: (1) se kombinuju bakteriostatska i baktericidna komponenta, (2) komponente imaju isto ciljno mesto delovanja, (3) komponente interaguju međusobno, jedna sa drugom (Hyldgaard i sar., 2012). Pretpostavke i hipoteze o sinergističkim ili antagonističkim interakcijama su bazirane na dosadašnjim rezultatima, a razvijanje novih tehnika na ovom polju dovešće do novog značajnog napretka u razumevanju načina na koji bioaktivne komponente utiču jedna na drugu kada deluju istovremeno.

Zbog potvrđene anti-*A. baumannii* aktivnosti pojedinih biljnih ekstrakata, a izostanaka aktivnosti njihovih bioaktivnih komponenti (katehin, kvercetin, emodin i cimetna kiselina), testirane su binarne kombinacije odabranih komponenti. Slično rezultatima primene pojedinačnih bioaktivnih komponenti biljnih ekstrakata, njihove binarne kombinacije takođe nisu ispoljile antibakterijski efekat protiv multiplo rezistentih *A. baumannii* izolata iz rana u

testiranom opsegu koncentracija. Tako na primer, kombinacija katehin-kvercetin nije inhibirala rast multiplo rezistentnih izolata vrste *A. baumannii*. Međutim, prema rezultatima Betts i sar. (2014), iako su MIC vrednosti kvercetina protiv kliničkih izolata vrste methicillin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) takođe bile veće od 256 mg L⁻¹, kombinacija kvercetina sa epigalokatehin galatom je za rezultat imala sinergistički efekat (FICI=0,2-0,5). Ova razlika u dobijenim rezultatima je najverovatnije posledica specifičnosti građe ćelijskog zida Gram pozitivnih bakterija, kao i razlike u hemijskoj strukturi katehina i njegovih derivata, tj. epigalokatehin galat. U literaturi ne postoje podaci o ovde testiranim kombinacijama (kvercetin-katehin, kvercetin-emodin, kvercetin-cimetna kiselina, katehin-emodin, katehin-cimetna kiselina, emodin-cimetna kiselina), kao ni aktivnosti ovih kombinacija protiv vrste *A. baumannii*. Izostanak anti-*A. baumannii* aktivnosti testiranih kombinacija komponenti ekstrakata je verovatno posledica činjenice da se radi o multiplo rezistentnim izolatima koji poseduju mnogobrojne mehanizme rezistencije na širok spektar antimikrobnih agenasa, kao što su na primer eflukse pumpe koje aktivno izbacuju štetne komponente izvan ćelije. Imajući u vidu da su biljni ekstrakti kompleksne mešavine velikog broja bioaktivnih komponenti i jedinjenja različitog hemijskog sastava, jasno je da mogu ostvariti različit efekat na bakterijsku ćeliju. Sa ovog aspekta, dobijeni rezultati su ipak značajni, jer ukazuju na to da je potrebno ispitati i ostale biološki aktivne komponente prisutne u biljnim ekstraktima, kao i efekat kombinacija više od dve bioaktivne komponente.

Glavni razlog nedovoljnog poznavanja i nerazumevanja pojave fenomena sinergizam/antagonizam je posledica nedostatka detaljnih informacija o mehanizmu aktivnosti pojedinačnih komponenti etarskih ulja. Za dalja istraživanja njihovog načina delovanja biće neophodni, osim standardizacije istraživačkih metoda, i dodatni eksperimenti za procenu interakcija među agensima, kao i implementacija novih tehnika. Takođe, korišćenje pristupa sistemske biologije za ispitivanje mehanizma delovanja antimikrobnih agenasa će bez sumnje unaprediti znanja na ovom polju. Osim toga, sinergističke kombinacije od komercijalnog interesa moraju biti procenjene u eksperimentalnim uslovima, koji odražavaju *in vivo* uslove u kojima će biti primenjivani. Ovo će otvoriti potpuno novi pravac istraživanja, koji će se fokusirati na formulaciju preparata na bazi etarskih ulja i/ili njihovih bioaktivnih komponenti za komercijalnu upotrebu.

7. ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljevima u ovom radu formirana je kolekcija kultura *Acinetobacter baumannii*, sa ukupno 29 sojeva. Sojevi iz kolekcije su identifikovani na osnovu fenotipskih osobina i/ili VITEK2 sistemom, a potvrda genovrste izvršena je primenom multipleks PCR sa specifičnim prajmerima. Od ukupno 31 soja, dva nisu identifikovana kao *A. baumannii*, već kao pripadnici Acb kompleksa. Na osnovu praćenja kinetike rasta, kao najpogodniji izvori ugljenika pokazali su se alanin, L-histidin i L-tirozin, dok su se pri izolaciji bakterije iz prirodnih uzoraka kao najpogodnije pokazale podloge sa acetatom i fenilalaninom u kombinaciji sa Herella agarom. Fenotipske karakteristike identifikovanih *A. baumannii* sojeva važne za proces formiranja biofilma potvrđuju da svi *A. baumannii* izolati poseduju sposobnost trzajućeg kretanja pomoću pila, da većina sojeva pokazuje umerenu autoagregativnost (83,9 % sojeva, a 16,1 % izrazitu autoagregativnost), umerenu hidrofobnost (80,7 % sojeva, dok je 19,3 % sojeva hidrofilno), da svi poseduju sposobnost produkcije lektina, visok stepen adhezije za polistiren (96,8 % izolata) i poseduju gen za Bap (eng. *Biofilm Associated Protein*) adhezioni protein. Svi sojevi *A. baumannii* korišćeni u ovoj studiji pokazali su rezistenciju na hloramfenikol i ceftriakson, većina na tetraciklin, kanamicin i trimetoprim/sulfametoksazol (86,2 % izolata), gentamicin (72,4 %), tobramicin i ciprofloksacin (69,0 %), netilmicin (51,7 %), dok su se kao najefikasniji antibiotici pokazali amikacin (38,0 % rezistentnih sojeva) i polimiksin B (31,0 % rezistentnih sojeva). Izolati su takođe ispoljili relativno visok stepen rezistencije i na imipenem (41,4 %). Kao kriterijum za procenu multiple rezistencije uzeta je rezistencija na tri ili više antibiotika iz hemijski različitih grupa ili na koje bakterija razvija različite mehanizme rezistencije i svi izolovani *A. baumannii* sojevi su okarakterisani kao multiplo rezistentni. Prisustvo beta laktamaza proširenog spektra *bla*_{PER-1} je detektovano kod 31,0 % izolata, integroni klase 1 kod svih sojeva iz kolekcije, a integroni klase 2 kod 24,1 % *A. baumannii* izolata. RAPD-PCR profili *A. baumannii* izolata dobijeni primenom pet dekamernih prajmera potvrdili su da su svi sojevi genovrste *A. baumannii* klonalno različiti i da je najdiskriminatorniji od korišćenih prajmera OPN-02. Detaljno okarakterisani sojevi iz kolekcije kultura korišćeni su za realizaciju ciljeva rada, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Od ukupno 39 ispitivanih etarskih ulja, anti-*A. baumannii* aktivnost pokazalo je 27 (69,2 %). Značajnu bakteriostatsku aktivnost ispoljila su etarska ulja vrsta *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*, *Salvia officinalis* i *Myrtus communis* za koje su detektovane relativno niske vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ($\leq 0,125$ - $2,83 \mu\text{L mL}^{-1}$). Lošu inhibitornu aktivnost ili čak potpuno odsustvo aktivnosti pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji ($4 \mu\text{L mL}^{-1}$) ispoljila su etarska ulja vrsta *Petroselinum crispum* i *Rosmarinus officinalis*, kao i većina etarskih ulja roda *Juniperus*. Etarska ulja ostalih ispitivanih biljnih vrsta ispoljila su umerenu anti-*A. baumannii* aktivnost (MIC je 2 - $4 \mu\text{L mL}^{-1}$).

-
- Baktericidna aktivnost etarskih ulja ($\leq 4 \mu\text{L mL}^{-1}$) je detektovana za 24 etarska ulja (59,0 %). Značajan baktericidan efekat su ispoljila etarska ulja koja su posedovala i izražen bakteriostatski efekat protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata iz rana (MBC $\leq 0,125\text{-}4 \mu\text{L mL}^{-1}$). Utvrđena statistički značajna razlika između detektovanih MIC i MBC vrednosti ukazuje da je za potpunu eradikaciju multiplo rezistentnih izolata potrebno primenjivati ove antimikrobne agense u višim koncentracijama, koje odgovaraju MBC.
 - Mikrostrukturalna posmatranja *A. baumannii* ćelija nakon tretmana odabranim etarskim uljima (*E. camaldulensis*, *M. communis*, *S. hortensis* i *T. serpyllum*) ukazala su na deformisanu morfologiju ćelija, pri čemu su jasno uočljiva mesta na kojima je došlo do rupture spoljašnje membrane. Ovo ukazuje da je primarni mehanizam delovanja ispitivanih etarskih ulja narušavanje integriteta spoljašnje, ali verovatno i citoplazmatske membrane ćelije, što za posledicu ima narušavanje permeabilnosti ćelije.
 - Prethodni zaključak potvrđuju i analize oslobađanja ćelijskog sadržaja, odnosno proteina, lipida i ugljenih hidrata iz ćelija, što je dokazano određivanjem njihove koncentracije u medijumu pre i nakon tretmana odabranim uljima. Najizraženije oslobađanje biomolekula iz bakterijskih ćelija zabeleženo je nakon tretmana ćelija etarskim uljima vrsta *M. communis*, *E. camaldulensis*, *O. majorana*, *S. hortensis* i *T. serpyllum*, dok su ostala testirana ulja ispoljila slabiji efekat. Utvrđena statistički značajna linearna korelacija između stepena oslobađanja ugljenih hidrata, proteina i lipida iz ćelije i primenjenih koncentracija etarskih ulja biljaka *M. communis*, *E. camaldulensis*, *T. serpyllum*, *S. hortensis*, *O. majorana*, *M. x piperita*, *H. officinalis*, *A. dracuncululus*, *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*, potvrđuje da ukupni efekat ulja zavisi od primenjene koncentracije, jer za etarska ulja biljaka koja su imala slab anti-*A. baumannii* efekat korelacija nije utvrđena.
 - Proteinski profil četiri *A. baumannii* izolata iz rana (Aba-4914, Aba-4156, Aba-4803 i Aba-8833) analiziran SDS-PAGE metodom je pokazao odsustvo značajne razlike u ekspresiji vidljivih proteina na gelovima nakon tretmana subinhibitornim koncentracijama etarskih ulja vrsta *M. communis* i *E. camadulensis*. Ovo ukazuje da tretman etarskim uljima ne dovodi do jasnih kvalitativnih promena ekspresije proteina. Takođe, uočeno smanjenje stepena sinteze proteina u tretiranim serijama ne može se smatrati rezultatom direktne inhibicije sinteze proteina, već oštećenja membranskih sistema ćelija i smanjenja brojnosti vijabilnih ćelija, a samim tim i posrednog smanjenja sinteze proteina.
 - Antibakterijski efekat biljnih ekstrakata je potvrđen za 6 od 14 ispitivanih ekstrakata (42,9 %). Izražen anti-*A. baumannii* efekat ispoljili su svi ekstrakti vrsta *Rumex*

sanguineus i *Rumex crispus* pri koncentracijama 0,5-2 mg mL⁻¹, dok za ekstrakte vrsta roda *Allium*, kao i vrste *Urtica dioica* nije utvrđena antibakterijska aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata (MIC >4 mg mL⁻¹). Ovakve razlike su prvenstveno posledica različitog kvalitativnog i kvantitativnog sastava ovih ekstrakata. Takođe, testirana jedinjenja koja se nalaze u biljnim ekstraktima: katehin, kvercetin, emodin i cimetna kiselina, nisu ispoljila anti-*A. baumannii* efekat (MIC >256 µg mL⁻¹), što je u skladu sa odsustvom aktivnosti ekstrakata biljka iz rodova *Allium* i *Urtica*, u kojima su ova jedinjenja prisutna.

- Bioautografija etarskih ulja *M. communis*, *E. camaldulensis* i *J. sabina* pokazala je da su za antibakterijsku aktivnost etarskih ulja protiv *A. baumannii* izolata odgovorne polarne terpenске komponente, tačnije terpenски alkoholi i terpenски aldehidi i ketoni. Uzimajući u obzir nedostatke korišćene metode, pre svega isparavanje lako isparljivih komponenti, niska koncentracija pojedinih komponenti nakon njihovog razdvajanja tankoslojnom hromatografijom i razlika u difuziji hidrofilnih i hidrofobnih komponenti, ne može se isključiti da i druge komponente ulja igraju ulogu u inhibiciji ispitivanih bakterija. Dobijeni rezultati za etarska ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* ukazuju da su njihove dominantne komponente posedovale antimikrobnu aktivnost (spatulenol, α-terpineol i linalol). Dakle, jasno je da je antibakterijska aktivnost u vezi sa komponentama koje su dominantno zastupljene u etarskom ulju, ali kao što je naglašeno, efekat manje zastupljenih komponenti takođe treba uzeti u obzir prilikom traganja za nekonvencionalnim antimikrobim agensima.
- Od ukupno 11 ispitanih komponenti etarskih ulja, kao najefikasnije bioaktivne komponente protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata izdvojili su se karvakrol (7-27,9 µg mL⁻¹), timol (22,6-76,1 µg mL⁻¹) i eugenol (90,5-304,4 µg mL⁻¹), koji su ostvarili antibakterijski efekat pri relativno niskim koncentracijama. Osim za ove komponente antimikrobna aktivnost je detektovana i za komponente α-pinen, (R)-(+)-limonen, sabinen, 3-karen i (-)-terpinen-4-ol u opsegu koncentracija 856-6727,2 µg mL⁻¹, dok α-teprinen, γ-terpinen i terpinolen nisu inhibirali rast *A. baumannii* ni pri najvišoj testiranoj koncentraciji (≥32000 µg mL⁻¹).
- Ispitivani sojevi pokazuju visok stepen adherencije za površinu zbog čega inhibicija formiranja biofilma predstavlja adekvatan pristup za kontrolu rasta *A. baumannii*. Ispitivanje efekta inhibicije formiranja biofilma u toku tretmana etarskim uljima vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* pokazalo je da su ova ulja efikasna pri koncentracijama 1-4 µL mL⁻¹, koje su veće ili jednake prethodno detektovanim MIC vrednostima. Osim efekta na proces formiranja biofilma, etarska ulja *M. communis* i *E. camaldulensis* su pri istim

koncentracijama ispoljila još izraženiji efekat na planktonske ćelije prisutne u medijumu tokom samog procesa formiranja biofilma, inhibirajući njihov rast i/ili smanjujući njihovu metaboličku aktivnost. S obzirom da su u nekim slučajevima subinhibitorne koncentracije etarskih ulja stimulisale produkciju biofilma, u cilju inhibicije formiranja biofilma neophodno je koristiti superinhibitorne koncentracije.

- Prema dobijenim rezultatima uklanjanja formiranog monospecijskog biofilma može se zaključiti da odabrana etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* imaju anti-biofilm aktivnost protiv multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata. Zabeležen efekat na 24 h starom *A. baumannii* biofilmu iznosio je 53-96 % redukcije ukupne biomase primenom etarskog ulja *M. communis*, odnosno 60-100 % redukcije ukupne biomase primenom etarskog ulja *E. camaldulensis* u trajanju od 24 h i u koncentracijama 2 i 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ etarskog ulja, u zavisnosti od primenjenog soja. Subinhibitorne koncentracije ovih ulja su u manjoj meri takođe uticala na uklanjanje biofilma, dok su kod nekih izolata stimulisala produkciju biofilma. Dobijeni rezultati potvrđuju da testirana etarska ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* poseduju značajnu antibakterijsku i anti-biofilm aktivnost i da ih treba uzeti u razmatranje prilikom razvoja budućih agenasa i dezinficijenasa za kontrolu širenja *A. baumannii* sojeva.
- Kombinacije prirodnih antimikrobnih agenasa, odnosno etarskih ulja vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* sa konvencionalnim antimikrobnim agenasima: gentamicinom, ciprofloksacinom i polimiksinom B su se pokazale kao izuzetno aktivne, u smislu velikog broja detektovanih sinergističkih interakcija. Detektovan je sinergistički efekat (FICI=0,25-0,50) ciprofloksacina, kao i polimiksina B u kombinaciji sa etarskim uljima vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* protiv izolata rezistentnih na pomenute antibiotike. Naime, ove kombinacije su dovele do redukcije MIC antibiotika, što je od posebnog interesa, s obzirom da niže koncentracije antibiotika smanjuju potencijane neželjene *in vivo* efekte ovih antimikrobnih agenasa. Takođe, poznato je i da kombinacije antibiotika generalno sprečavaju pojavu i/ili širenje antibiotske rezistencije koje se dešavaju tokom monoterapije, tj. primene samo jednog agenasa. Imajući u vidu da poslednjih godina postoji povećan interes za upotrebu prirodnih antimikrobnih agenasa, primena nekonvencionalnih prirodnih agenasa u kombinaciji sa konvencionalnim, predstavlja značajnu strategiju za kontrolu rasta *A. baumannii*.
- Polimiksin B je antibiotik izbora u slučajevima infekcije multiplo rezistentnim sojevima ove bakterije, a njegov pojačan antibiotski efekat u kombinaciji sa etarskim uljima vrsta *M. communis* i *E. camaldulensis* potvrđen je dodatno kinetikom inhibicije bakterijskog rasta. Redukcija brojnosti *A. baumannii* primenom kombinacije agenasa iznosila je više od 4 log u poređenju sa efektom polimiksina B i više od 6 log u odnosu na tretman

uljima. Dobijena interakcija je okarakterisana kao sinergistička, jer je eradikacija postignuta sa $1/4 \times \text{MIC}$ etarskog ulja i $1/4 \times \text{MIC}$ antibiotika protiv multiplo rezistentnog izolata iz rane. Pored smanjenja koncentracija neophodnih za eradikaciju *A. baumannii*, značajna je i veoma brza redukcija brojnosti ćelija do granice detekcije nakon samo 6 h inkubacije. Dalja ispitivanja bi trebalo sprovesti u *ex vivo* i *in vivo* uslovima za kombinaciju etarskog ulja eukaliptusa i polimiksina B, kao aktivnih komponenti u tretmanu površinskih rana.

- Kao relativno efikasna strategija za eradikaciju multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata pokazale su se binarne kombinacije bioaktivnih komponenti, dok binarne kombinacije komponenti biljnih ekstrakata nisu ispoljile inhibitorski efekat na bakterijski rast. Efekat kombinacija bioaktivnih komponenti etarskih ulja okarakterisan je kao sinergistički za neke kombinacije, kao što su karvakrol-timol i eugenol-timol, ali su interakcije češće okarakterisane kao aditivne ili indiferentne. Imajući u vidu da su etarska ulja i biljni ekstrakti kompleksne mešavine velikog broja bioaktivnih komponenti, dobijeni rezultati navode na zaključak da je potrebno ispitati binarne kombinacije ostalih biološki aktivnih komponenti prisutnih u prirodnim antimikrobnim agensima, kao i efekat kombinacija više od dve bioaktivne komponente.
- Kombinovanje konvencionalnih antimikrobnih agenasa i odabranih komponenti etarskih ulja: timol, karvakrol i eugenol se pokazalo kao veoma efikasan pristup za eradikaciju multiplo rezistentnih *A. baumannii* izolata. Sinergističke interakcije su potvrđene za kombinacije ciprofloksacina sa ovim bioaktivnim komponentama protiv oba ispitivana *A. baumannii* izolata. Interakcija gentamicina sa sve tri testirane bioaktivne komponente je takođe okarakterisana kao sinergistička, ali samo protiv referentnog soja. Kombinacije polimiksina B i ovih bioaktivnih komponenti su okarakterisane kao indiferentne, ali su i pored toga dovele do redukcije minimalnih inhibitorskih koncentracija antibiotika, za razliku od sinergističkih interakcija. Na osnovu toga može se zaključiti da osim tipa interakcije između agenasa koji se kombinuju, njihov ukupan efekat zavisi od karakteristika samog soja, tj. stepena rezistencije na testirani antibiotik, odnosno od visine utvrđenih vrednosti MIC i udaljenosti ovih koncentracija od terapijski prihvatljivih doza.

Multiplo rezistentni sojevi genomske vrste *Acinetobacter baumannii* bili su osetljivi na većinu ispitivanih nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa, zbog čega ovi agensi imaju izuzetan potencijal u kontroli rasta ove vrste. Visok stepen osetljivosti ove bakterije na bioaktivne komponente etarskih ulja, tačnije karvakrol, timol i eugenol ukazuje da ovi agensi poseduju najveći potencijal. Ove komponente su delovale u veoma niskim koncentracijama, koje su u opsegu aktivnosti konvencionalnih antimikrobnih agenasa, a njihova prednost u odnosu na etarska ulja i biljne ekstrakte je i ta što sastav etarskih ulja i biljnih ekstrakata

može znatno da varira pod uticajem niza faktora. Pomenute komponente etarskih ulja ostvaruju još bolji efekat kada se koriste u kombinaciji sa konvencionalnim antibioticima. Detektovana aktivnost nekonvencionalnih agenasa je od izuzetnog značaja i neophodna su dalja ispitivanja mogućnosti njihove primene u lokalnom tretmanu rana inficiranih multiplo rezistentnim sojevima *A. baumannii* u *ex vivo* i *in vivo* uslovima, a potom i odgovarajuće kliničke studije.

8. *LITERATURA*

-
- Abbott, I., Cerqueira, G.M., Bhuiyan, S., Peleg, A.Y. (2013): Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Laboratory Challenges, Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies. Expert Reviews Anti-Infective Therapy, 11(4):395-409.
- Abdellatif, F., Hassani, A. (2015): Chemical composition of the essential oils from leaves of *Melissa officinalis* extracted by hydrodistillation, steam distillation, organic solvent and microwave hydrodistillation. Journal of Materials and Environmental Science, 6(1):207-213.
- Absolon, D.R. (1988): The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. Canadian Journal of Microbiology, 34:287-289.
- ACD/ChemSketch (Freeware version); ACD/Labs Release 11.00, Product version 11.02 (Build 25941, May 2008), Advanced Chemistry Development, Inc.
- Adams, M.D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K.M., Lavender, H., Jamison, J.J., MacDonald, I.J., Martin, K.M., Russo, T., Campagnari, A.A., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Gill, S.R. (2008): Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Bacteriology, 190:8053-8064.
- Adams, R.P. (2001): Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry, Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.
- Adams, R.P. (2008): *Juniperus* of the World: The genus *Juniperus* 2nd edition. Trafford Publishing Co., Vancouver, Canada.
- Adams, R.P., Altarejos, J., Fernandez, C., Camacho, A. (1999): The leaf essential oils and taxonomy of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, subsp. *badia* (H. Gay) Bedeaus, and subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.). Ball. Journal of Essential Oil Research, 11:167-172.
- Ahmadi, L., Mirza, M., Shahmir, F. (2002): The volatile constituents of *Artemisia marschaliana* Sprengel and its secretory elements. Flavour and Fragrance Journal, 17:141-143.
- Ahmed, A.A., Zain, U., Abjuluziz M.A., Rius, U., Iubul, H., Muhammad, T. (2012): Evaluation of the chemical composition and element analysis of *Urtica dioica*. African Journal of Pharmacy, 6(21):1555-1558.
- Ahsan, M., Islam, S.N. (1996): Garlic: a broad spectrum antibacterial agent effective against common pathogenic bacteria. Fitoterapia, 47(4): 374-376.
- Akhila, A. (2006): Essential oil-bearing grasses, the genus *Cymbopogon*. In: Hardman, R. (ed.) Medicinal and aromatic plants – industrial profiles. New York: CRC Press, 1-262.
- Akin, M., Aktumsek, A., Nostro, A. (2010): Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. African Journal of Biotechnology, 9(4):531-535.
- Alm, T. (2003): *Juniperus sabina* in Norwegian folk tradition. Sevenbom *Juniperus sabina* i folketradisjonen i Norge, 61:186-189.
- Al-Nuri, M.A., Zalar, N.A., Natsheh, M., Hannoun, M.A., Jondi, W., Husein, A. (1996): Emodin, a naturally occurring anthraquinone: its isolation and spectrophotometric determination in *Rumex cyprius* plant. Spectroscopy Letters, 29(8):1539-1543.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Froufe, H.J.C., Abreu, R.M.V., Martins, A., Pintado, M. (2013): Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. Journal of Applied Microbiology, 1-12.
- Amensour, M., Bouhdid, S., Fernandez-Lopez, J., Idaomar, M., Senhaji, N.S., Abrini, J. (2010): Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. International Journal of Food Properties, 13:1215-1224.
- Anačkov, G. (2009): Taksonomija i horologija roda *Allium* L. 1754 (Amaryllidales, Alliaceae) u Srbiji. Doktorska disertacija, PMP UNS, Novi Sad.
-

-
- Andrade, E.H.A., Alves, C.N., Guimaraes, E.F., Carreira, L.M.M., Maia, J.G.S. (2011): Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L. C Rich Biochemical Systematic and Ecology, 39:669–765.
- Andrews, R.E., Parks, L.W., Spence, K.D. (1980): Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 40:301–304.
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M.T., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. (2003): Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51:3073–3078.
- Anstey, N.M., Currie, B.J., Hassell, M., Palmer, D., Dwyer, B., Seifert, H. (2002): Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. Journal of Clinical Microbiology, 40:685–686.
- Ashraf, M., Ali, O., Anwar, F., Hussain, A.I. (2010): Composition of leaf essential oil of *Eucalyptus camaldulensis*. Asian Journal of Chemistry, 22(3):1779-1786.
- Ayepola, O.O., Adeniyi, B.A. (2008): The antibacterial activity of leaf extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). Journal of Applied Sciences Research, 4(11):1410-1413.
- Babik, J., Bodnarova, L., Sopko, K. (2008): *Acinetobacter*: serious danger for burn patients. Acta Chirurgiae Plasticae, 50(1):27-32.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J. (2004): Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiology, 21:33–42.
- Bajko, E., Kalinowska, M., Borowski, P., Siergiejczyk, L., Lewandowski, W. (2016): 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. LWT - Food Science and Technology, 65:471-479.
- Bakht, J., Khan S., Shafi, M. (2013): Antimicrobial potential of fresh *Allium cepa* against Gram positive and Gram negative bacteria and fungi. Pakistan Journal of Botany, 45(S1):1-6.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46(2):446–475.
- Bankar, R., Kumar, A., Puri, S., Ali, I., Sharma, A., Khan. I.A. (2011): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from seed of *Coriandrum sativum* L. Analytical Chemistry Letters, 1(2):189-193.
- Barr, A. (1988): Traditional bush medicines. An aboriginal pharmacopoeia: aboriginal communities of the Northern Territory of Australia. Greenhouse Publications, Richmond, Victoria, Australia.
- Basri, D.F., Khairon, R. (2012): Pharmacodynamic interaction of *Quercus infectoriagalls* extract in combination with vancomycin against MRSA using microdilution checkerboard and time-kill assay. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2012:150–156.
- Bassett, I.B., Pannowitz, D.L., Barnetson, R.S. (1990): A comparative study of tea-tree oil versus benzoylperoxide in the treatment of acne. Medical Journal of Australia, 153:455–458.
- Bassetti, M., Righi, E., Esposito, S., Petrosillo, N., Nicolini, L. (2008): Drug treatment for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Future Microbiology, 3(6):649-660.
- Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R. (2012): Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules, 17:3989-4006.
- Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H. (2010): Composition and antimicrobial activities of *Lippium multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. Molecules, 15:7825–7839.
- Basson, A., Flemming, L. A., Chenia, H. Y. (2007): Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. Microbial Ecology, 55:1-14.

-
- Baumann, P. (1968): Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *Journal of Bacteriology*, 96(1):39–42.
- Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R. (1968): A study of the *Moraxella* group II oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology*, 95:1520-1541.
- Beauburn, G., Gray, G.E. (2000): A review of herbal medicines for psychiatric disorders. *Psychiatric Services*, 51:1130-1134.
- Becerril, R., Nerin, C., Gomez-Lus, R. (2012): Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne pathogens and disease*, 9(8):699-705.
- Bedi, M.K., Shenefelt, P.D. (2002): Herbal therapy in dermatology. *Archiv of Dermatology*, 138:232-242.
- Bekhechi, C., Bekkara, F.A., Consiglio, D., Bighelli, A., Tomi, F. (2012): Chemical variability of the essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, 9:2742-2753.
- Benkeblia, N. (2004): Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37(2):263–268.
- Ben Othman, A., Zribi, M., Masmoudi, A., Abdellatif, S., Ben Lakhal, S., Fendri, C. (2011): Multiresistance and endemic status of *Acinetobacter baumannii* associated with nosocomial infections in Tunisian hospital: A critical situation in intensive care units. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42:415-422.
- Berenbaum, M. (1989): What is synergy? *Pharmacological Reviews*, 41:93-141.
- Bergogne-Bérézin, E., Towner, K. J. (1996): *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9:148–165.
- Berka Zougali, B., Ferhat, M., Hassani, A., Chemat, F., Allaf K. (2012): Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *International Journal of Molecularbiology Sciences*, 13(4):4673-4695.
- Bernotienė, G., Nivinskienė, O., Butkienė, R., Mockutė, D. (2007): Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemija*, 18(4):38–43.
- Betts, J. W. Hornsey, M. Wareham, D. W. (2014): *In vitro* activity of epigallocatechin gallate (EGCG) and quercetin alone and in combination versus clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *ASM 2014 Barts and the London, School of Medicine and Dentistry*.
- Bignell, C.M., Dunlop, P.J., Brophy, J.J., Jackson, J.F. (1996): Volatile leaf oils of some South-western and southern Australian species of the genus *Eucalyptus* Part VII-subgenus symphyomyrtus, section exsertaria. *Flavour and Fragrance Journal*, 11:35-41.
- Blečić, V. (1970): Rod *Urtica* L. U: Josifović, N. (ur.) *Flora SR Srbije II*. SANU Beograd, 63-65.
- Blumenthal, M., Busse, W. R., Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (Germany). (1998): The complete German Commission E monographs. Austin, Tex: American Botanical Council.
- Boiteux, J., Soto Vargas, C., Pizzuolo, P., Lucero, G., Silva, M.F. (2014): Phenolic characterization and antimicrobial activity of folk medicinal plant extracts for their applications in olive production. *Electrophoresis*, 35(11):1709-1718.
- Bolla, J.M., Alibert-Franco, S., Handzlik, J., Chevalier, J., Mahamoud, A., Boyer, G., Kieć-Kononowicz, K., Pagès, J.M. (2011): Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 585:1682–1690.
- Bonyadian, M., Karim, G. (2002): Study of the effects of some volatile oils of herbs against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in broth media. *J Fac Vet Med Univ Tehran*, 57:81-83.
- Borrelli, F., Izzo, A.A. (2000): The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*, 14:581-591.
- Boti, J.B., Bighelli, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Casanova, J. (2006): Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC–MS and C-NMR. *Flavour and Fragrance Journal*, 21:268 –273.
-

-
- Bou, G., Cervero, G., Dominguez, M.A., Quereda, C., Martinez-Beltran, J. (2000): Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:3299–3305.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S, Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. (2009): Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48:1–12.
- Boujaafar, N., Frenay, J., Bouvet, P. J. M., Jeddi, M. (1990): Cell surface hydrophobicity of 88 clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *Research Microbiology*, 141(4):477-482.
- Boukadida, J. (2000): Ecological aspects and prophylaxis of *Acinetobacter baumannii* nosocomial. *Tunis Medicine*, 78(8-9):480-483.
- Bouvet, P., Grimont, P. (1986): Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36:228-240.
- Bouvet, P.J., Jeanjean, S. (1995): Differentiation of *Acinetobacter calcoaceticus* sensu stricto from related *Acinetobacter* species by electrophoretic polymorphism of malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and catalase. *Research in Microbiology*, 146(9):773–785.
- Bown, D. (1995): *Encyclopedia of Herbs and Their Uses*. The Royal Horticultural Society, Dorling Kindersley, London, UK, 423-424.
- Bowles, E.J. (2003): *The chemistry of aromatherapeutic oils*. 3rd ed. South Australia: Griffin Press.
- Boyle, W. (1955): Spices and essential oils as preservatives. *American Perfumes and Essential Oils Review*, 66:25-28.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Bogavac, M., Suvajdzic, Lj., Simin, N., Samojlik, I., Couladis, M. (2008): Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele essential oils. *Molecules*, 13:2058-2068.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007): Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:7879–7885.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G. (2006): Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:1822-1828.
- Bradesi, P., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., Bernardini, A.F. (1997): Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France). *Journal of Essential Oil Research*, 9:283–288.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Braun, L., Choen, M. (2010): *Herbs and Natural Supplements*. Elsevier Australia, 40-43.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. (2005): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Volume two: Proteobacteria; Part B: The Gammaproteobacteria*. 2nd Ed. Garrity, G. M. Springer.
- Brisou, J., Prevot, A. (1954): Studies on bacterial taxonomy. The revision of species under *Achromobacter* group. *Annales de L'institut Pasteur. Microbiologie (Paris)*, 86:722-728.
- Brossard, K.A., Campagnari, A.A. (2011): The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 80(1):228-233.
- Brown, A.E. (2007): *Benson's Microbiological applications: Laboratory manual in General Microbiology*. The McGraw-Hill Book Company.
- Brown, D. (1995): *Encyclopedia of herbs and their uses*. Dorling Kindersley, NY.
-

-
- Brown, S., Young, H.K., Amyes, S.G.B. (2005): Characterization of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*, 11:15-23.
- Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223–253.
- Burt, S.A., Vlieland, R., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J.A. (2005): Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*, 68(5):919–926.
- Bush, K., Jacoby, G.A. (2010): Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3):969–976.
- Caballero, B., Trugo, L.C., Finglas, P.M. (2003): *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Dinotta, F., Geraci, D., Morganti, P. (2000): Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. *International Journal of Tissue Reactions*, 22 (1):5-13.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H.A. (2003): Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87:215–220.
- Canter, P.H., Ernst, E. (2002): *Ginkgo biloba*: a smart drug? A systematic review of controlled trials of the cognitive effects of *Ginkgo biloba* extracts in healthy people. *Psychopharmacology Bulletin*, 36:108-123.
- Capasso, F., Gaginella, T.S., Grandolini, G., Izzo, A.A. (2003): *Phytotherapy: A quick reference to herbal medicine*. Kolundžija, Z., Kodrić, B. urednici: *Fitoterapija: Priručnik biljne medicine*, 2005. izdanja za Srbiju i Crnu Goru IK Prometej, Novi Sad.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. (2002): Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1914–1920.
- Carson, C.F., Riley, T.V. (1995): Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78:264–269.
- Cellini, L., Di Campli, E., Masulli, M., Di Bartolomeo, S., Allocati, N. (1996): Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 13(4):273-277.
- Cevahir, N., Demir, M., Kaleli, I., Gurbuz, M., Tikvesli, S. (2009): Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Microbiology, Immunology and Infections*, 41:513–518.
- Cavaleiro, C. (2001): *Óleos essenciais de Juniperus de Portugal*, vol. I. PhD Thesis, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Cavanagh, H.M.A., Wilkinson, J.M. (2002): Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research*, 16(4):301–308.
- Chahardehi, A.M., Ibranim, D., Sulaimani, S.F., Mousavi, L. (2012): Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *International Journal of Tropical Biology*, 60(4):1567-1576.
- Chaleshtori, R.S., Rokni, N., Razavilar, V., Kopaei, M.R. (2013): The evaluation of the antibacterial and antioxidant activity of tarragon (*Artemisia dracunculoides* L.) essential oil and its chemical composition. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(9):e7877.
- Chalchat, J.C., Garry, R.P., Michet, A. (1997): Variation of chemical composition of essential oil of *Mentha piperita* L. during the growing time. *Journal Essential Oil Research*, 9:463-465.
- Chandler, R.F., Hooper, S.N., Harvey, N.J. (1982): Ethnobotany and phytochemistry of yarrow. *Achillea millefolium*, Compositae. *Economic Botany*, 36:203–215.
-

-
- Chang, H.C., Wei, Y.F., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, C.T., Chang, T.C. (2005): Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:1632–1639.
- Chehregani, A., Azimishad, F., Hajalizade, H. (2007): Study on antibacterial effect of some *Allium* species from Hamedan-Iran. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9(6):873-876.
- Chen, T.L., Siu, L.K., Wu, R.C.C., Shaio, M.F., Huang, L.Y., Fung, C.P., Lee, C.M., Cho, W.L. (2007): Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infections*, 13:801–806.
- Chishti, S., Kaloo, Z.A., Sultan, P. (2013): Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(10):170-177.
- Choi, A.H.K., Slamti, L., Maira-Litrán, T. (2009): The *pgaABCD* Locus of *Acinetobacter baumannii* Encodes the Production of Poly- β -1-6-*N*-Acetylglucosamine. *Journal of Bacteriology*, 191(19):5953-5963.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001): Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65:232–260.
- Chukwujekwu, J.C., Coombes, P.H., Mulholland, D.A., van Staden, J. (2006): Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*. *South African Journal of Botany*, 72(2):295-297.
- Ciocan, I.D., Bara, I. (2007): Plant products as antimicrobial agents. *Analele tiințifice ale Universității, Alexandru Ioan Cuza, Secțiunea Genetică Biologie Moleculară*, 8:151–156.
- Clark, A.M. (1996): Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*, 13:1133-1144.
- Clarke, P.A. (2014): *Discovering Aboriginal Plant Use: The Journeys of an Australian Anthropologist*. Rosenberg Publishing Pty Ltd. Australia.
- Clemmer, K. M., Bonomo, R. A., Rather, P. N. (2011): Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*, 157(9):2534-2544.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2007): Seventh Informational Supplement CLSI document M100-S17, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 19087-1898.
- Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) (2011): Public statement on the use of herbal medicinal products containing thujone. European Medicines Agency, Science Medicines Health, London, UK.
- Consentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Arzedi E., Palmas, F. (1999): *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of sardinian *Thymus essential* oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29:130–135.
- Cooper, M.L., Laxer, J.A., Hansbrough, J.F. (1991): The cytotoxic effects of commonly used topical antimicrobial agents on human fibroblasts and keratinocytes. *Journal of Trauma*, 31(6):775–782.
- Coopoosamy, R.M., Magwa, M.L. (2006): Antibacterial activity of aloe emodin and aloin A isolated from *Aloe excelsa*. *African Journal of Biotechnology*, 5 (11):1092-1094.
- Corre, J., Lucchini, J.J., Mercier, G.M., Cremieux, A. (1990): Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Research in Microbiology*, 141:483–497.
- Corry, J.E., Van Doorne, H., Mossel, D.A.A. (1977): Recovery and revival of microbial cells, especially those from environments containing antibiotics, In: Woodbine, M. (ed.) *Antibiotics in agriculture*. Proceedings of the 25th Easter School, University of Nottingham. Butterworths, London, UK, 174–196.
- Corvec, S., Caroff, N., Espaze, E., Giraudeau, C., Drugeon, H., Reynaud, A. (2003): AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52:629–635.
-

-
- Corzo-Martinez, M., Corzo N., Villamiel M. (2007): Biological properties of onions and garlic. *Food Science and Technology*, 18:609-625.
- Council of Europe (2008): Safety monographs on specific active ingredients. In: Active ingredients used in cosmetics: safety survey. Council of Europe Publishing, Strasbourg, 7-137.
- Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:564-582.
- Cushine, T.P., Lamb, A.J. (2005): Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26:343–356.
- da Costa, A.C., dos Santos, B.H.C., Santos Filho, L., Lima, E.O. (2009): Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(1B):236-241.
- Dallo, S.F., Weitao, T. (2010): Insights into *Acinetobacter* war-wound infections, biofilms, and control. *Advances in Skin & Wound Care*, 23(4):169-174.
- Dalton, T., Dowd, S.E., Wolcott, R.D., Sun, Y., Watters, C., Griswold, J.A., Rumbaugh, K.P. (2011): An *in vivo* polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS ONE*, 6(11):e27317.
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Bremont, S., Lambert, T., Courvalin, P. (2008): AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:557-562.
- Dar, S. A., Ahmad Ganai, F., Yousuf, A. R., Balkhi, M., Bhat, T.M., Bhat, F.A. (2012): Bioactive potential of leaf extracts from *Urtica dioica* L. against fish and human pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 6(41):6893-6899.
- Davidson, P.M., Naidu, A.S. (2000): Phyto-phenol. In: Naidu, A.S. (ed.) *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 65–294.
- Davidson, P.M., Parish, M.E. (1989): Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, 43:148–155.
- Deans, S.G., Svoboda, K.P. (1988): Antibacterial activity of french tarragon (*Artemisia dracunculus* Linn.) essential oil and its constituents during ontogeny. *Journal of Horticultural Science*, 63:503-508.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. (2002): Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74:101–109.
- Dellacassa, E., Menendez, P., Monyna, P., Soler, E. (1990): Chemical composition of *Eucalyptus* essential oils grown in Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal*, 5:91-95.
- De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Mignola, E., Senatore, F. (2009): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*, 14:2735-2746.
- Denyer, S.P., Hugo, W.B. (1991): Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane, In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (eds.) *Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 171–187.
- de Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., van Vuuren, S. (2013): The *in vitro* antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1:1-10.
- Derwich, E. Chabir, R. (2011): Identification of the volatile constituents of the essential oil of *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) from the north centre region of Morocco. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(1):50-54.
- De Sousa, D.P. (2011): Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*, 16:2233–2252.

-
- De Sousa, J.P., Torres, R.A., Azaredo, G.A., Figueiredo, R.C.B.Q., Vasconcelos, M.A.s., DE Souza, E.L. (2012): Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in vegetable-based broth. *International Journal of Food Microbiology*, 158:9-13.
- Dhawan, B., Srimal, R.C. (1998): *Laboratory Manual for Pharmacological Evaluation of Natural Product*. ICS UNIDO. Vienna, Austria, p 69.
- Diao, W.R., Hu, Q.P., Zhang, H., Xu, J.G. (2014): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35(1):109–116.
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E., Garaizar, J., Ursing, J., Pitt, T.L. (1996): Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:1519–1525.
- Dijkshoorn, L., Aucken, H.M., Gerner-Smidt, P., Kaufmann, M.E., Ursing, J., Pitt, T.L. (1993): Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:702–705.
- Dijkshoorn, L., Van Harsselaar, B., Tjernberg, I., Bouvet, P.J.M., Vaneechoutte, M. (1998): Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Systematic and Applied Microbiology*, 21:33–39.
- Djilani, A., Dicko, A. (2012): The therapeutic benefits of essential oils. In: Bouayed, J., Bohn, T. (eds.) *Nutrition, well-being and health*. InTech, 155–178.
- Diklić, N. (1974): *Porodica Lamiaceae L. U: Josifović, M. (ur.) Flora SR Srbije VI. SANU Beograd*, 357-519.
- Di Nocera, P.P., Rocco, F., Giannouli, M., Triassi, M., Zarrilli, R. (2011): Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiology*, 11(224):1471-218.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. (2007): Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:4863–4870.
- Dirschl, D.R., Wilson, F.C. (1991): Topical antibiotic irrigation in the prophylaxis of operative wound infections in orthopedic surgery. *Orthopedic Clinics of North America*, 22(3):419–426.
- Doi, Y., Arakawa, Y. (2007): 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45:88–94.
- Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L., Monti-Bragadin, C. (1995): Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S–23S rRNA intergenic spacer sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1108–1113.
- Donlan, R. M. (2002): Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9):881-890.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000): Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88:308–316.
- Duarte, A., Ferreira, S., Silva, F., Domingues, F.C. (2012): Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*, 19(3-4):236-238.
- Duarte, A.F., Ferreira, S., Oliveira, R., Domingues, F.C. (2013): Effect of coriander oil (*Coriandrum sativum*) on planktonic and biofilm cells of *Acinetobacter baumannii*. *Natural Product Communications*, 8(5):673-678.
- Duke, J.A. (1985): *Handbook of medicinal herbs*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dupont, M., Pages, J.M., Lafitte, D., Siroy, A., Bollet, C. (2005): Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter genospecies* 13 TU. *Journal of Proteome Research*, 4:2386-2390.
- Duval, J., Soussy, C.J., Koumare, B., Juliet, C., Deforges, L. (1982): Evolution des bacteries hospitalieres. *Pathologie Biologie*, 30:405-414.
-

-
- Dvorkin, L., Song, K.Y. (2002): Herbs for benign prostatic hyperplasia. *Annual Pharmacotherapy*, 36:1443-1452.
- Ebrahimi, S.N., Hadian, J., Ranjbar, H. (2010): Essential oil compositions of different accessions of *Coriandrum sativum* L. from Iran. *Natural Products Research*, 24(14):1287–1294.
- Ehrenstein, B., Bernards, A.T., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Towner, K.J., Bouvet, P.J.M., Daschner, F.D., Grundmann, H. (1996): *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:2414–2420.
- Eloff, J.N. (2004): Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay guided fractionation. *Phytomedicine*, 11:370–371.
- El-Sawi, S.A., Motawae, H.M., Ali, A.M. (2007): Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, 4(4):417–426.
- Ennajjar, M., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Abderraba, M., Raies, A., Romdhane, M. (2009): Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *Journal of Food Sciences*, 74(7):M364-371.
- Ernst, E., (2003): Complementary medicine. *Current Opinion Rheumatology*, 5:151-155.
- Ernst, E., Chrubasik, S. (2000): Phyto-anti-inflammatories. A systematic review of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. *Rheumatic disease clinics of North America*, 26:13-27.
- Espinal, P., Martí, S., Vila, J. (2012): Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Hospital Infection*, 80(1):56-60.
- Eucast definitive document E. Def 1.2, (2000): Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).
- European Pharmacopoeia (2002): Council of Europe: Strasbourg Cedex, fourth ed. European Pharmacopoeia, France, 183–184 (2.8.12).
- Eveleigh, T. (1994): Lavender. Lorenz Books, Sydney, Australia.
- Falagas, M.E., Kasiakou, S.K. (2006): Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care*, 10(1):R27.
- Falahati, M., Tabrizi, N., Jahaniani, F. (2005): Anti-dermatophyte activities of *Eucalyptus camaldulensis* in comparison with griseofulvin. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 4:80-83.
- Fatemeh, F., Hamedeyazdan, S. (2011): A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 5(8):1959-1966.
- US Food and Drug Administration (FDA) (1976 – 1990): Federal Regulations, 41, 38312, 47, 22712, 47, 54646, 52, 30042, 55, 46914.
- Fejes, S.Z., Blazovics, A., Lemberkovics, E. (2000): Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracts from *Anthriscus cerefolium* L. (*Hoffm.*) and *Petroselinum crispum* (*Mill.*) Nym. Ex A.W. Hill. *Phytotherapy Research*, 14:362–365.
- Felső, P., Horváth, G., Tímea Bencsik, T., Godányi, R., Lemberkovics, E., Böszörményi, A., Böddi, K., Takátsy, A., Molnár, P., Kocsisa, B. (2013): Detection of the antibacterial effect of essential oils on outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* by lab-on-a-chip and MALDI-TOF/MS. *Flavour and Fragrance Journal*, 28:367–372.
- Flavoring Extract Manufacturers' Association (FEMA) (1965): Survey of flavoring ingredient usage levels. No. 2465, *Food Technol.* Champaign 19 (2), part 2:155.
- Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M.C., Ayala, J.A., Perea, E.J., Pascual, A. (2003): Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding
-

-
- protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51:565–574.
- Fiorina, J.C., Weber, M., Block, J.C. (2010): Occurrence of lectins and hydrophobicity of bacteria obtained from biofilm of hospital catheters and water pipes. *Journal of Applied Microbiology*, 89:494-500.
- Fletcher, N., Sofianos, D., Berkes, M.B., Obremsky, W.T. (2007): Prevention of perioperative infection. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 89:1605–1618.
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J. (1999): Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18:761–770.
- Ford, R.A. (1988): Myrtenyl acetate. In: Opdyke, D.L.J.(ed.) *Monographs on Fragrance Raw Materials, Special Issue VII, Food and Chemical Toxicology*, Pergamon Press Ltd. Oxford, UK. 26(4):389.
- Fournier, P.E., Richet, H. (2006): The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases*, 42:692–699.
- Fournier, P.E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J.M. (2006): Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*, 2:e7.
- Gaddy, J.A., Actis, L.A. (2009): Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology*, 4:273–278.
- Gajić, M. (1975): Porodica Asteraceae L. U: Josifović, M. (ur.) *Flora SR Srbije VII*. SANU Beograd, 90-122.
- Gallego, L., Kevin, J.T. (2001): Carriage of class one integrons and antibiotics resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. *Journal of Medical Microbiology*, 50:71-77.
- Gallucci, M.N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., Demo, M. (2009): Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24:348–354.
- Gandham, N.R., Gupta, N., Jadhav, S.V., Misra, R.N. (2012): Isolation of *Acinetobacter baumannii* from cerebrospinal fluid following craniotomy, *Med. J. DY. Patil. Univ.*, 5(2):151-153.
- García-García, R., López-Malo, A., Palou, E. (2011): Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, 76:M95–100.
- Gaynes, R., Edwards, J.R. (2005): Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases*, 41:848–854.
- Geissman, T.A. (1963): *Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds*, Elsevier, New York.
- Geronemus, R.G., Mertz, P.M., Eaglstein, W.H. (1979): Wound healing the effects of topical antimicrobial agents. *Archive of Dermatology*, 115 (11):1311–1314.
- Gershenson, J. (1994): Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology*, 20:1281–1290.
- Ghaima, K.K., Hashim, N.M., Ali, S.A. (2013): Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(05):096-099.
- Ghasemi, A.P. (2009): Medicinal plants used in Chaharmahal and Bakhtyari districts, *Iranian Herbal Pol.* 55: 69–75.
- Giamarellou, H., Antoniadou, A., Kanellakopoulou, K. (2008): *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(2): 106-119.
- Gibbons, S. (2008): Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 74:594–602.
- Gilbert, P. (1984): The revival of microorganisms sublethally injured by chemical inhibitors, p. 175–197. In Andrews, M.H.E., Russell, A.D. (ed.), *The revival of injured microbes*. Academic Press, London, UK.
-

-
- Gill, A.O., Holley, R.A. (2006a): Disruption of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *L. sakei* cellular membranes by plant essential oils aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108:1–9.
- Gill, A.O., Holley, R.A. (2006b): Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 3:170–174.
- Gkrania-Klotsas, E., Hershov, R.C. (2006): Colonization or infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* may be an independent risk factor for increased mortality. *Clinical Infectious Diseases*, 43:1224–1225.
- Go, E.S., Urban, C., Burns, J., Kreiswirth, B., Eisner, W., Mariano, N., Mosinka-Snipas, K., Rahal, J.J. (1994): Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymixin B and sulbactam. *The Lancet*, 344:1329–1332.
- Goh, H.M., Beatson, S.A., Totsika, M., Moriel, D.G., Phan, M.D., Szubert, J., Runnegar, N., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L., Nimmo, G.R., Lipman, J., Schembri, M.A. (2013): Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 79:6535–6543.
- Goncagul, G.I., Ayaz, E. (2010): Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*). *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 5:91–93.
- Gonçalves, L.V. (2013): Influence of hydrodynamic conditions on bacteria physiology and behavior. Master Degree in Bioengineering, Major in Biological Engineering, Faculty of Engineering of University of Porto, University of Sheffield.
- Gonzalez, G., Sossa, K., Bello, H., Dominguez, M., Mella, S., Zemelman, R. (1998): Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, 161:125–128.
- Gradisar, H., Pristovsek, P., Plaper, A., Jerala, R. (2007): Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(2):264–271.
- Grbović, S. (2010): Hemijska karakterizacija i biološke aktivnosti vrsta *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. i *Eucalyptus gunnii* Hook. iz Crne Gore. Doktorska disertacija, PMF UNS, Novi Sad.
- Grieve, M., Leyel, C. F. (1931): *A modern herbal: The medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folk-lore of herbs, grasses, fungi, shrubs, & trees with all their modern scientific uses.* New York: Harcourt, Brace & Co.
- Groppo, F.C., Ramacciato, J.C., Simoes, R.P., Florio, F.M., Sartoratto, A. (2002): Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *International Dental Journal*, 52:433–437.
- Gu, B., Tong, M., Zhao, W., Liu, G., Ning, M., Pan, S., Zhao, W. (2007): Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:241–243.
- Guenther, E. (1950): *The essential oils*, van Nostrand Co., Inc.: New York, NY, USA.
- Guerra, F.Q., Mendes, J.M., Sousa, J.P., Morais-Braga, M.F., Santos, B.H., Melo Coutinho, H.D., Lima Ede, O. (2012): Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Natural Product Research*, 26(23):2235–2238.
- Guerrero, D.M., Perez, F., Conger, N.G., Solomkin, J.S., Adams, M.D., Rather, P.N., Bonomo, R.A. (2010): *Acinetobacter baumannii*-associated skin and soft tissue infections: recognizing a broadening spectrum of disease. *Surgical Infections*, 11(1):49–57.
- Gülçin, T., Küfrevioğlu I., Oktay M., Büyükkuroğlu, M.E. (2004): Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90:205–215.
- Gulluce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sökmen, A., Sahin, F. (2003): *In vitro* antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol
-

-
- extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:3958–3965.
- Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S.L., Kaushik, D. (2010): Pharmacological potential of *Matricaria recutita*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2:12–16.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R. (1998): Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26:194–198.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B. (2003): Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 89:67–71.
- Hamilton-Miller, J.M.T. (1997): Chemical and biological properties of tea infusions. Frankfurt: U&M, Germany, 63-75.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999): Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86:985–990.
- Hanafy, M.S., Shalab, S.M., El-Fouly, M.A., Abd el-Aziz, M.I., Soliman, F.A. (1994): Effect of garlic on lead contents in chicken tissues. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 101:157-158.
- Hall, R.M., Collis, C.M. (1995): Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 15:593–600.
- Halm, M.A. (2008): Essential oils for management of symptoms in critically ill patients. *American Journal of Critical Care*, 17:160–163.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., von Wright, A. (1998): Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46:3590–3595.
- Harris, R. (2003): Synergism in the essential oil world. *International Journal of Aromatherapy*, 12:179–186.
- Hawkins, S.G. (2014): Antimicrobial activity of cinnamic acid, citric acid, cinnamaldehyde, and levulinic acid against foodborne pathogens. Honors Thesis Projects, University of Tennessee, USA, 1-8.
- Hemaiswarya, S., Doble, M. (2009): Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against gram negative bacteria. *Phytomedicine*, 16:997–1005.
- Hemaiswarya, S., Doble, M. (2010): Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria. *Journal of Medicinal Microbiology*, 59:1469–1476.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M. (2008): Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15:639–52.
- Heritier, C., Poirel, L., Lambert, T., Nordmann P. (2005): Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:3198–3202.
- Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D., Seifert H. (2004): Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54:821–823.
- Hoffmann, D. (2010): *Materia Medica*. In: Hoffman, D. (ed.) *Medical Herbalism: The Science and Practice of Herbal Medicine*. Part two: Treatment approaches by body system. Healing Arts Press, 559-568.
- Horne, D.S., Holm, M., Oberg, C., Chao, S., Young, D.G. (2001): Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Essential Oil Research*, 13:387–392.
- Horváth, G., Jámbo, N., Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., Héthelyi, É., Kovács, K., Kocsis, B. (2010): Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC–bioautography. *Flavour and Fragrance Journal*, 25:178–182.
- Hörster, H. (1974): Comparison of the monoterpene fractions of *Juniperus drupacea* and *Juniperus oxycedrus*. *Planta Medica*, 26:113–118.
-

-
- Huang, L.Y., Chen, T.L., Lu, P.L., Tsai, C.A., Cho, W.L., Chang, F.Y., Fung, C.P., Siu, L.K. (2008): Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Clinical Microbiology and Infections*, 14:1010–1019.
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A.M., Cavrini, V. (2002): GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29:691-700.
- Hugo, W.B., Longworth, R. (1964): Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, 16:655–662.
- Hujer, K.M., Hamza, N.S., Hujer, A.M., Perez, F., Helfand, M.S., Bethel, C.R., Thomson, J.M., Anderson, V.E., Barlow, M., Rice, L.B., Tenover, F.C., Bonomo, R.A. (2005): Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:2941–2948.
- Hujer, K.M., Hujer, A.M., Hulten, E.A., Bajaksouzian, S., Adams, J.M., Donskey, C.J., Ecker, D.J., Massire, C., Eshoo, M.W., Sampath, R., Thomson, J.M., Rather, P.N., Craft, D.W., Fishbain, J.T., Ewell, A.J., Jacobs, M.R., Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2006): Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:4114–4123.
- Hunter, M. (2009): *Essential oils: art, agriculture, science, industry and entrepreneurship*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Mayer, R.L. (2012): Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12):1-24.
- Iacono, M., Villa, L., Fortini, D., Bordoni, R., Imperi, F., Bonnal, R.J., Sicheritz-Ponten, T., De Bellis, G., Visca, P., Cassone, A., Carattoli, A. (2008): Whole genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European Clone II group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7):2616-2625.
- Imelouane, B., Amhandi, H., Wathelet, J.P., Ankit, M., Khedid, K., El Bachiri, A. (2009): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco. *International journal of agriculture and biology*, 11(2):205-208.
- Ino, T., Nishimura, Y. (1989): Taxonomic studies of *Acinetobacter* species based on outer membrane protein patterns. *Journal of General and Applied Microbiology*, 35:213-224.
- Inouye, S., Yamaguchi, H., Takizawa, T. (2001): Screening of the antibacterial effects of variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 7:251–254.
- Jalsenjak, V., Peljnjak, S., Kustrak, D. (1987): Microcapsules of sage oil, essential oils content and antimicrobial activity. *Pharmazie*, 42: 419-420.
- Janković, M.M. (1974): Rod *Mentha* L. i *Ocimum* L. U: Josifović, M. (ur.) *Flora SR Srbije VI*. SANU Beograd, 509-519.
- Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouvet, P., Kersters, K., Dijkshoorn, L. (1997): Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47:1179–1187.
- Jawad, A., Hawkey, P.M., Heritage, J., Snelling, A., M. (1994): Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herella agar and Holton's agar, Department of Microbiology, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, United Kingdom.
- Jawad, A., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkey, P.M. (1998): Comparison of ARDRA and recA-RFLP analysis for genomic species identification of *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 165:357–362.
-

-
- Jazani, N.H., Mikaili, P., Shayegh, J., Haghighi, N., Aghamohammadi, N., Zartoshti, M. (2012): The hydro-alcoholic extract of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. has antibacterial activity on multi-drug resistant bacteria isolates. *Journal of Applied Biological Sciences*, 6(1):37-40.
- Jazani, N.H., Zartoshti, M., Babazadeh, H., Ali-daiee, N. (2011): Antibacterial effects of *Artemisia dracunculus* essential oil on multi-drug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Bacteriology Journal*, 1(1):31-36.
- Jazani, N.H., Zartoshti, M., Babazadeh, H., Ali-daiee, N., Zarrin, S., Hosseini, S. (2009): Antibacterial effects of Iranian fennel essential oil on isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(9):738-41.
- Jerassy, Z., Yinnon, A.M., Mazouz-Cohen, S., Benenson, S., Schlesinger, Y., Rudensky, B., Raveh, D. (2006): Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. *Journal of Hospital Infection*, 62:230–236.
- Jerkovic, I., Radonic, A., Borcic, I. (2002): Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils from Croatian *Myrtus communis* L. during a one-year vegetative cycle. *Journal Essential Oil Research*, 14:266–270.
- Jiang, L.Y., Xue, X.D., Wei, L.H., Si, X.Q., Lui, G., Zhou, H., Yu, Y. (2008): Detection of integron, homology and genotype of carbapenemases in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wound. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 24(6):432-436.
- Johnson, E.N., Burns, T.C., Hayda, R.A., Hospenthal, D.R., Murray, C.K. (2007): Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clinical Infectious Diseases*, 45:409–415.
- Jones, F.A. (1996): Herbs-useful plants. Their role in history and today. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 8:1227–1231.
- Jones, G.A., McAllister T.A., Muir A.D., Cheng K.J. (1994): Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:1374–1378.
- Joswick, H.L., Corner, T.R., Silvernale, J.N., Gerhardt, P. (1971): Antimicrobial actions of hexachlorophene: release of cytoplasmic materials. *Journal of Bacteriology*, 108:492–500.
- Jovanović, B. (1982): *Juniperus* L. U: Sarić, M.R. (ud.) *Flora Srbije I*. SANU Beograd, 127-139.
- Juliani, H.R., Biurun, F., Koroch, A.R., Oliva, M.M., Demo, M.S., Trippi, V.S., Zygadlo, J.A. (2002): Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica* mold. *Planta Medica*, 68:756–762.
- Kampfer, P. (1993): Grouping of *Acinetobacter* genomic species by cellular fatty acid composition. *Medical Microbiology Letters*, 2:394-400.
- Kang, H. J., Ansbacher, R., Hammoud, M.M. (2002): Use of alternative and complementary medicine in menopause. *International Journal of Gynaecology Obstety*, 79:195-207.
- Kaplan, N., Rosenberg, E., Jann, B., Jann, K. (1985): Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *European Journal of Biochemistry*, 152:453-458.
- Karatan, E., Watnick, P. (2009): Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2):310-347.
- Karlowsy, A., Draghi, D., Jones, M., Thornsberry C., Friendland, I., Sahn, D. (2003): Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United states, 1998 to 2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(5):1681-1688.
- Kazmi, M.H., Malik, A., Hameed, S., Akhtar, N., Noor Ali, S. (1994): An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry*, 36:761–763.
-

-
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., Lewis, K. (2004): Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1):13-18.
- Kempf, M., Eveillard, M., Deshayes, C., Ghamrawi, S., Lefrançois, C., Georgeault, S., Joly-Guillou, M. L. (2012): Cell surface properties of two differently virulent strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(3):311-317.
- Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilinc, E., Karatas, H. (2010): Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3):99-103.
- Knežević, P. (2005): Antibiotiska rezistencija vrste *Escherichia coli* izolovane iz crevnog trakta klinički zdravih goveda, svinja i živine. Magistarska teza, PMF UNS, Novi Sad.
- Knežević, P. (2009): Primena *Pseudomonas aeruginosa* bakteriofaga kao antimikrobnih agenasa. Doktorska disertacija, PMF UNS, Novi Sad.
- Knežević, P., (2012): Bakteriofagi – alternativni antimikrobni agensi. Zadužbina Andrejević, Beograd, 9-11.
- Knezevic, P., Curcin, S., Aleksic, V., Petrusic, M., Vlaski, L. (2013): Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combating *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 164:55–60.
- Knezevic, P., Petrovic, O. (2008a): Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(4):360-363.
- Knezevic, P., Petrovic, O. (2008b): A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 74(2-3):114-118.
- Knowles, J.R., Roller, S., Murray, D.B., Naidu, A.S. (2005): Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:797-803.
- Koczura, R., Przystalowska, B., Mokracka, J., Kaznowski, A. (2014): Class 1 integrons and antibiotic resistance of clinical *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in Poznan, Poland. *Current Microbiology*, 69:258–262.
- Koeleman, J.G.M., Stoof, J., Van Der Bijl, M.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Savelkoul, P.H.M. (2001): Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1):8-13.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T. (1997): Autumn essential oils of greek oregano. *Phytochemistry*, 44:883-886.
- Koljalg, S., Vuopio-Varkila, J., Lyytikainen, O., Mikelsaar, M., Wadstrom, T. (1996): Cell surface properties of *Acinetobacter baumannii*, *APMIS*, 104(78):659-665.
- Kollanoor Johny, A.K., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. (2010): Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. *Foodborne Pathogens Diseases*, 7:1165–1170.
- Konakchiev, A., Genova, E., Couladis, M. (2004): Chemical composition of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart in Bulgaria. *Comptes Rendus De L Academie Bulgare Des Sciences*, 57:49-52.
- Kong, B.H., Hanifah, Y.A., Yusof, M.Y., Thong, K.L. (2011): Application of amplified ribosomal DNA restriction analysis in identification of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary teaching hospital, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 28(3):563-568.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A. (2005): Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24):9452-9458.
-

-
- Kostanjšek, R., Pirc-Marolt, T. (2015): Pathogenesis, tissue distribution and host response to *Rhabdochlamydia porcellionis* infection in rough woodlouse *Porcellio scaber*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125:56-67.
- Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A. (2005): Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of the gum of *Pista-cialentiscus* Var. *chia*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53:7681–7685.
- Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K. (2008): Antimicrobial activity of anethole and related compounds from aniseed. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 88:242-247.
- Kurcic-Trajkovska, B. (2009): *Acinetobacter* spp. – A serious enemy threatening hospitals Worldwide. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2(2):157-162.
- Kuźniewski, E., Augustyn-Puziewicz, J. (2006): *Przyroda apteką*. Wyd. Dolnośląskie. Wrocław.
- Kwieciński, J., Eick, S., Wójcik, K. (2009): Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33:343-347.
- Kwon, Y.S., Choi, W.G., Kim, W.J., Kim, W.K., Kim, M.J., Kang, W.H., Kim, C.M. (2002): Antimicrobial constituents of *Foeniculum vulgare*. *Archives of Pharmacology Research*, 25:154–157.
- Laekeman, G.M., Van Hoof, L., Haemers, A., Berghe, D.A.V., Herman, A.G., Vlietinck, A.J. (1990): Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. *Phytotherapy Research*, 4:90–96.
- Lakušić, B.S., Ristić, M.S., Slavkowska, V.N., Stojanović, D.Lj., Lakušić, D.V. (2013): Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. *Botanica Serbica*, 37(2):127-139.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 91:453–462.
- Lambert, P.A. (2002): Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 42(95):22-26.
- Langeveld, W.T., Veldhuizen, E.J.A., Burt, S.A. (2014): Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1):76–94.
- Langmead, L., Rampton, D.S. (2001): Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease—benefits and dangers. *Alimentary Pharmacology and Therapy*, 15:25-44.
- LaPlante, K.L. (2007): *In vitro* activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(4):413-418.
- Lawless, J. (1995): *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils: The Complete Guide to the Use of Oils in Aromatherapy and Herbalism*, Element Books Limited, Rockport, Mass, USA.
- Le, L. (2008): Study on the class 1 integrons resistance and biofilm among *Acinetobacter baumannii*. Master's thesis, Central South University, Changsha, China.
- Lee, J.C., Koerten, H., Broek, P., Beekhuizen, H., Wolterbeek, R., Barselaar, M., Reijden, T., Meer, J., Gevel, J., Dijkshoorn, L. (2006): Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Research in Microbiology*, 157:360-366.
- Lee, H.W., Koh, Y.M., Kim, J., Lee, J.C., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Kim, J. (2008): Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical Microbiology and Infections*, 14:49-54.
- Lemar, K.M., Passa, O., Aon, M.A., Cortassa, S., Müller, C.T., Plummer, S., O'Rourke, B., Lloyd, D. (2005): Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. *Microbiology*, 151(10):3257-3265.
-

-
- Leporatti, M.L., Ivancheva, S. (2003): Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:123–142.
- Lesjak, M. (2011): Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. (Cupressaceae). Doktorska disertacija, PMF UNS, Novi Sad.
- Lesjak, M., Simin, N., Orcic, D., Franciskovic, M., Knezevic, P., Beara, I., Aleksic, V., Svircev, E., Buzas, K., Mimica-Dukic, N. (2015): The binary mixture of *Satureja hortensis* and *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oils as a potent antimicrobial agent against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research*, doi: 10.1002/ptr.5552.
- Lewis, K. (2005): Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry*, 70(2):267-274.
- Lewis, K. (2008): Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322:107-131.
- Lima, L.M., Babakhani, B., Boldaji, S.A.H., Asadi, M., Boldaji, R.M. (2013): Essential oils composition and antibacterial activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *International Journal of Aromatic Plants*, 3(2):214-219.
- Limansky, A.S., Mussi, M.A., Viale, A.M. (2002): Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:4776–4778.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., Lewis, K. (2015): A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517:455–459.
- Liolios, C.C., Graikou, K., Skaltsa, E., Chinou, I. (2010): Dittany of Crete: a botanical and ethnopharmacological. *Journal of Ethnopharmacology*, 131:229–421.
- Lis-Balchin, M. (2006): *Aromatherapy science: A guide for healthcare professionals*. Pharmaceutical Press Great Britain.
- Lis, H., Sharon, N. (2003): Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, *Chemical Reviews*, 98:637–674.
- Livingston, A.L., Bickoff, E.M., Lundin, R.E., Jurd, L. (1964): Trifoliol, a new coumestan from ladino clover. *Tetrahedron*, 20:1963-1970.
- Liu, Y., Tay, J.H. (2002): The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36(7):1653-1665.
- Lockhart, S. R., Abramson, M.A., Beekmann, S.E., Gallagher, G., Riedel, S., Diekema, D.J., Quinn, J.P., Doern, G.V. (2007): Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:3352–3359.
- Loehfelm, T.W., Luke, N.R., Campagnari, A.A. (2008): Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Journal of Bacteriology*, 190:1036-1044.
- Lorenzi, V., Muselli, A., Bernardini, A.F., Berti, L., Pagès, J.M., Amaral, L., Bolla, J.M. (2009): Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gramnegative species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:2209–2211.
- Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007): Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100:603–608.
- Longbottom, C.J., Carson, C.F., Hammer, K.A., Mee, B.J., Riley, T.V. (2004): Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54:386-392.
-

-
- Longo, F., Vuotto, C., Donelli, G. (2014): Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiologica*, 37:119-127.
- Luo, L., Wu, L., Xiao, Y., Zhao, D., Chen, Z., Kang, M., Zhang, Q., Xie, Y. (2015): Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. *BMC Microbiology*, 15:62-69.
- Luper, S. (1998): A review of plants used in the treatment of liver disease: part I. *Alternative Medical Review*, 3:410-421.
- Luper, S. (1999): A review of plants used in the treatment of liver disease: part II. *Alternative Medical Review*, 4:178-188.
- Lv, F., Liang, H., Yan, Q., Li, C. (2011): *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9):3057-3064.
- Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I., Takahashi, T. (1999): *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(7):1788-1791.
- Mahammed Ali, A.N. (2014): Cytotoxic effect of the purified lectin from locally isolate *Acinetobacter baumannii* on Hep-2 tumor cell line. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(26): 168-173.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L. (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infections*, 18(3):268-281.
- Malik, A., Sakamoto, M., Hanazaki, S., Osawa, M., Suzuki, T., Tochigi, M., Kakii, K. (2003): Coaggregation among nonflocculating bacteria isolated from activated sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, 69:6056-6063.
- Marongiu, B., Porcedda, S., Carredda, A., Gioannis, B.D., Vargiu, L., Colla, P.L. (2003): Extraction of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: Influence of some process parameters and biological activity, *Flavour and Fragrance Journal*, 18:390-397.
- Marriott, J.P., Shellie, R., Cornwell, C. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*. 936:1-22.
- Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Ribera, A., Rodriguez-Bano, J., Bou, G., Cisneros, J.M., Pachon, J., Martinez-Martinez, L., Vila, J., Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria (2006): Prevalencia de los genes tetA y tetB como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clinicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 24:77-80.
- Marti, S., Nait Chabane, Y., Alexandre, S., Coquet, L., Vila, J., Jouenne, T., Dé, E. (2011): Growth of *Acinetobacter baumannii* in pellicle enhanced the expression of potential virulence factors, *PLoS ONE*, 6(10):e26030.
- Martin, A., Varona, S., Navarrete, A., Cocero, M.J. (2010): Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Open Chemical Engineering Journal*, 4:31-41.
- Masakova, N.S., Tseevatuy, B.S., Trofimenko, S.L., Remmer, G.S. (1979): The chemical composition of volatile oil in lemon-balm as an indicator of therapeutic use. *Planta Medica*, 36:274.
- Masood, N., Chaudhry, A., Saeed, S., Tariq, P. (2007): Antibacterial effect of oregano (*Oreganum vulgare*) against Gram negative bacilli. *Pakistan Journal of Botany*, 39:609-613.
- Masoud, E.A. i Gouda, H. A. (2012): Effect of some natural plant extracts against gram negative bacteria in Njran Area, Saudi Arabia. *Egyptian Academic Journal Biological Sciences*, 4(1):85-92.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki N., Majima, T., Nishimura S.I., Lee Y.C. (2005): Carbohydrate analysis of phenol-sulphuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339:69-72.
-

-
- Mattos-Guaraldi, A. L., Formiga, L. C. D., Andrade, A. F. B. (1999): Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corinebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Current Microbiology*, 38:37-42.
- McCabe, M., Gohdes, D., Morgan, F., Eakin, J., Sanders, M., Schmitt, C. (2005): Herbal therapies and diabetes among Navajo Indians. *Diabetes Care*, 28(6):1534–1535.
- McDougald, D., Klebensberger, J., Tolker-Nielsen, J., Webb, J.S., Conibear, T., A. Rice, S., Kirov, S.M., Matz, C., Kjelleberg, S. (2008): *Pseudomonas aeruginosa*: A model for biofilm formation. Ed. Rehm, B. H. A. Wiley-WHC Verlag GmbH & Co. KgaA.
- McLafferty, F.W. (2005): Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, seventh ed. John Wiley & Sons, Ltd., New York, NY, USA.
- McMahon, L., George, B. (2010): *Eucalyptus camaldulensis*. State of New South Wales through Department of Industry and Investment.
- McQueary, C.N., Actis, L.A. (2011): *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties; *The Journal of Microbiology* 49(2):243-250.
- Medić, D., Mihajlović Ukropina, M., Gusman V., Jelesić Z., Milosavljević B. (2011): Rezistencija na karbapeneme kod sojeva *Acinetobacter* spp izolovanih iz briseva rana tokom 2009. i 2010. godine. *Medicinski Pregled*, Novi Sad, LXIV (11-12):583-587.
- Medini, H., Manongiu, B., Aicha, N., Chekir-Ghedira, L, Harzalla-Skhiri, F., Khouja, M.L. (2013): Chemical and antibacterial polymorphism of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Cupressaceae) leaf essential oils from Tunisia. *Journal of Chemistry*, 2013:1-8.
- Medini, H., Elaissi, A., Khouja, M.L., Chraief, I., Farhat, F., Hammami, M., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F. (2010): Leaf essential oil of *Juniperus oxycedrus* L. (Cupressaceae) harvested in Northern Tunisia: composition and intra-specific variability. *Chemistry and Biodiversity*, 7:1254-1266.
- Medini, H., Elaissi, A., Larbi Khouja, M., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Chemli, R. (2011): Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Juniperus phoenicea* L. berries. *Natural Products Research*, 25(18):1695-706
- Melchior, M.B, Vaarkamp, H., Fink-Gremmels, J. (2006): Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Veterinary Journal*, 171:398-407.
- Metan, G., Alp, E., Aygen, B., Sumerkan, B. (2007a): *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60:197–199.
- Metan, G., Alp, E., Aygen, B., Sumerkan, B. (2007b): Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29:112–113.
- Mhamedi, I., Hassaine, H., Bellifa, S., Lachachi, M., Terki, I. K., Djeribi, R. (2014): Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* isolated from medical devices at the intensive care unit of the University Hospital of Tlemcen (Algeria), *African Journal of Microbiology Research*, 8(3):270-276.
- Microcal (TM) Origin, Version 6.0, Microcal Software, Inc. Northampton, USA, 1991-1999.
- Miguel, M.G., Cruz, C., Faleiro, L., Simões, M.T., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2010): *Foeniculum vulgare* essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Products Communication*, 5(2):319-28.
- Mihajilov-Krstev, T., Kitic, D., Stojanovic-Radic, Z., Zlatkovic, B. (2010): Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains. *Archiv of Biological Sciences*, 62:159–166.
- Miller, A.L. (1998): Botanical influences on cardiovascular disease. *Alternative Medicine Review*, 3:422-431.
- Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001): Quorum sensing in bacteria; *Annual Review of Microbiology*, 55:165–199.
-

-
- Millikan, L.E. (2002): Complementary medicine in dermatology, *Clinical Dermatology*, 20:602-605.
- Milos, M., Radonic, A. (2000): Gas chromatography mass spectral analysis of free and glycosidically bound volatile compounds from *Juniperus oxycedrus* L. growing wild in Croatia. *Food Chemistry*, 68:333-338.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N. (2004): Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52:2485-2489.
- Mimica-Dukić, N., Božin, B. (2007): Essential oils from Lamiaceae species as promising antioxidant and antimicrobial agents. *Natural Product Communication*, 2(4):445-452.
- Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbović, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Orčić, D., Jovin, E., Couladis, M. (2010): Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules*, 15:2759–2770.
- Miyasaki, Y., Nichols W.S., Morgan, M. A., Kwan, J.A., Van Benschoten M.M., Kittell P. E., Hardy W. D. (2010): Screening of herbal extracts against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Phytotherapy Research*, 24:1202–1206.
- Mohsenzadeh, M. (2007): Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (20):3693-3697.
- Montagu, A., Saulnier, P., Cassissa, V., Rossines, E., Eveillard, M., Joly-Guillou, M.L. (2014): Aromatic and terpenic compounds loaded in lipidic nanocapsules: activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* assessed *in vitro* and in a murine model of sepsis. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 5(3):206-213.
- Moon, S.E., Kim, H.Y., Cha, J.D. (2011): Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archive of Oral Biology*, 56:907–916.
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I. (2005): Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborn pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38:565-570.
- Mourey, A., Canillac, N. (2002): Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13:289–292.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. (2010): Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oils of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17:1061-1066.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Reichling, J., Wink, M. (2011): Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and selected components against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical Biology*, 49:893-899.
- Naas, T., Bogaerts, P., Bauraing, C., Degheldre, Y., Glupczynski, Y., Nordmann, P. (2006): Emergence of PER and VEB extended-spectrum betalactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58:178–182.
- Naas, T., Nordmann P., Heidt A. (2007): Intercountry transfer of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from Romania. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29:226–228.
- Namba, T., Morita, O., Huang, S.L., Goshima, K., Hattori, M., Kakiuchi, N. (1988): Studies on Cardio-Active Crude Drugs; I. Effect of Coumarins on Cultured Myocardial Cells. *Planta Medica*, 54:277-282.
- Nascimento, G.G. F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva, G.L. (2000): Antibacterial activity of plant extracts and physiochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:247-256.

-
- National Toxicology Program (2011): Toxicology and carcinogenesis studies of alpha, beta-thujone (CAS No. 76231-76-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Technical Report Series. National Toxicology Program, 570:1-260.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003): Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved standard M7-A6, NCCLS, Wayne, Pa.
- Neilands, J.B. (1995): Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biology and Chemistry*, 270:26732-26726.
- Nemec, A., De Baere T., Tjernberg I., Vaneechoutte M., van der Reijden T.J., Dijkshoorn, L. (2001): *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:1891–1899.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007): Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70:461-477.
- Newton, M., Combest, W., Kosier, J.H. (2001): Selected herbal remedies used to treat common urologic conditions. *Urologic Nursing*, 21:232-234.
- Nicholson, T. L., Conover, M. S., Deora, R. (2012): Transcriptome profiling reveals stage-specific production and requirement of flagella during biofilm development in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS ONE*, 7(11):e49166.
- Niesink, R.J.M., de Vries, J., Hollinger, M.A. (1996): Toxicology. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo.
- Nikolić, V. (1973): Porodica Apiaceae L. U: Josifović, M. (ed.) Flora SR Srbije V. SANU Beograd, 222-348.
- NIST/EPA/NIH (2005): Mass Spectral Library with Search Program: (Data Version: NIST 05, Software Version 2.0d). National Institute of Standards and Technology, New York, NY, USA.
- Nitiema, L.W., Savadogo, A., Simpore, J., Dianou, D., Traore, A.S. (2012): *In vitro* antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. *International Journal of Microbiological Research*, 3(3):183-187.
- Niu, C., Gilbert, E.S. (2004): Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12):6951-6956.
- Nordmann, P., Naas, T. (1994): Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(1):104-114.
- Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R. (2007): Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 519-523.
- Nowak, A., Burkiewicz, A., Kur J. (1995): PCR differentiation of seventeen genospecies of *Acinetobacter*. *FEMS Microbiology Letters*, 126:181–187.
- Nuryastuti, T., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Irvati, S., Aman, A.T., Krom, B.P. (2009): Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21):6850–6855.
- Nwomeh, B.C., Yager, D.R., Cohen, I.K. (1998): Physiology of chronic wound. *Clinics in Plastic Surgery*, 25:341-356.
- Obana, Y. (1986): Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. *Microbial Immunology*, 30:645-657.
- Onawunmi, G.O., Ogunlana, E.O. (1985): Effects of lemon grass oil on the cells and spheroplasts of *Escherichia coli* NCTC 9001. *Microbios Letters*, 28:63–68.
- Opdyke, D.L.J. (1978): Monographs on fragrance raw materials. Canadian snakeroot oil. *Food Cosmetology and Toxicology* 16:853-857.
-

-
- Orav, A., Kailas, T., Jegorova, A. (2003): Composition of the essential oil of dill, celery, and parsley from Estonia. *Estonian Academy Publishers*, 52(4):1-7.
- Orav, A., Arak, E., Raal, A. (2006): Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. from various European Countries. *Natural Products Research*, 20(12):1082-1088.
- Orhana, D.D., Ozcelik, B., Ozgen, S., Ergun, F. (2010): Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, 165:496-504.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014): Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143:48–53.
- Ormancey, X., Sisalli, S., Coutiere, P. (2001): Formulation of essential oils in functional perfumery. *Parfums, Cosmetiques, Actualites*, 157:30–40.
- Osman, Y.A.H., Yaseen, E.M., Farag, M.M. (2009): Antimicrobial effect of some essential oils mixtures. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(9):1265-1276.
- O'Toole, G. A. i Kolter, R. (1998): Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Molecular Microbiology*, 30(2):295-304.
- Owlia, P., Sadari, H., Rasooli, I., Sefidkon, F. (2009): Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2):107-114.
- Oyedepi, A.O., Ekundayo, O., Olawoye, O.N., Adeniyi, B.A., Koenig, W.A. (1999): Antimicrobial activity of essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia*, 70:526–528.
- Oyedemi, S.O., Okoh, A.I., Mabinya, L.V., Pirochenva, G., Afolayan, A.J. (2009): The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 8(7):1280–1290.
- Ozcan, M.M., Sagdic, O., Ozkan, G. (2006): Inhibitory effects of spice essential oils on the growth of *Bacillus* species. *Journal of Medicinal Food*, 9:418-421.
- Ozer, H., Sokmen, M., Gulluce, M., Adiguzel, A., Kilic, H., Sahin, F., Sokmen, A., Baris, O. (2006): *In vitro* antimicrobial antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Italian Journal of Food Sciences*, 1(18):73-83.
- Özseven, A.G., Cetin, E.S., Aridogan, B.C., Özseven, L. (2012): *In vitro* synergistic activity of carbapenems in combination with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(12):2985–2992.
- Palaniappan, K., Holley, R.A. (2010): Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140:164–168.
- Pankey, G.A., Ashcraft, D.S. (2009): The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest® and time-kill assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63:228–232.
- Pappas, R.S., Sheppard-Hanger, S. (2000): The essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from south Florida: A high cryptone/low cineole eucalyptus. *Journal of Essential Oil Research*, 12:383-384.
- Paragioudaki, M., Stamouli, V., Kolonitsiou, F., Anastassiou, E.D., Dimitracopoulos, G., Spiliopoulou, I. (2004): Intravenous catheter infections associated with bacteraemia: a 2-year study in a University Hospital. *Clinical Microbiology Infections*, 10:431-435.
- Park, S.N., Lim, Y.K., Freire, M.O., Cho, E., Jin, D., Kook, J.K. (2012): Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, 18:369-372.
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005): Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4):657–686.
-

-
- Patil, J.R., Jog, N.R., Chopade, B.A. (2001): Isolation and characterization of *Acinetobacter* spp. from upper respiratory tract of healthy humans and demonstration of lectin activity. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 19(1):30-35.
- Paton, R.H., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S.G.B. (1993): ARI-1: Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2:81-88.
- Pauli, A., Kubeczka, K.H. (2010): Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. *Natural Products and Community*, 5:1387–1394.
- Pavliček, A., Pavliček, T., Flegr, J. (1999): Free Tree 0.9.1.50. *Folia Biologica (Praha)*. 45:97-99.
- Pegula, F.P., Bastailer, K.H.C., Kurkctailouglu, M. (2000): Essential oil composition of *Eucalyptus camalddunensis* Dehn. from Mozambique. *Journal of Essential Oil Research*, 12:333–335.
- Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P., Xu, J. (2009): Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *Journal of Food Science*, 74:379–383.
- Peleg, A.J., Seifert, H., Paterson, D.L. (2008): *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful Pathogen; *Clinical Microbiology Review*, 21(3):538-582.
- Pelletier, R.P. (2012): Effect of plant-derived molecules on *Acinetobacter baumannii* biofilm on abiotic surfaces. Honors Scholar Theses. University of Connecticut, USA.
- Pereira, P., Cebola, M.J., Bernardo-Gil, M.G. (2012): Comparison of antioxidant activity in extracts of *Myrtus kcommunis* L., obtained by SFE vs. solvent extraction. *Journal of Environmental Science and Health A*, 1:115–20.
- Pereira, P.C., Cebola, M.J., Bernardo-Gil, M.G. (2009): Evolution of the yields and com-position of essential oil from Portuguese myrtle (*Myrtus comunis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules*, 14:3094–3105.
- Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N., Bonomo, R.A. (2007): Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:3471–3484.
- Perry, N.S., Bollen, C., Perry, E.K., Ballard, C. (2003): *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75:651–659.
- Peterson, A.A., Fesik, S.W., McGroarty, E.J. (1987): Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(2):230–237.
- Peterson, J.W. (1996): Bacterial pathogenesis. In: *Medicinal Microbiology*, ed. Barow, S. Galveston: University of Texas Medical Branch.
- Petrović, O., Gajin, S., Matavulj, M., Radnović, D., Svirčev, Z. (1998): Mikrobiološko ispitivanje kvaliteta površinskih voda. Institut za biologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Phillips, P., Sampson, E., Yang, O., Antonelli, P., Progulske-Fox, A., Schultz, G. (2008): Bacterial biofilms in wounds. *Wound Healing Southern Africa*, 1(2):10-12.
- Phuong, K., Kakii, K., Nikata, T. (2009): Intergeneric coaggregation of non-flocculating *Acinetobacter* spp. isolates with other sludge-constituting bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(4):394-400.
- Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N. (2006): Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311:808–811.
- Pillai, S.K., Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M. (2005): Antimicrobial combinations. In: Lorian, V. (ed.) *Antibiotics in laboratory medicine*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 365-440.
- Pinn, G. (2001): Herbal therapy in respiratory disease. *Australian Family Physician*, 30:775-779.

-
- Ploy, M.C., Denis, F., Courvalin, P., Lambert T. (2000): Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: Description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10):2684-2688.
- Poirel, L., Cabanne, L., Vahaboglu, H., Nordmann, P. (2005): Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase *bla*-PER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:1708–1713.
- Poirel, L., Karim, A., Mercat, A., Le Thomas, I., Vahaboglu, H., Richard, C., Nordmann, P. (1999): Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(1):157-158.
- Poirel, L., Nordmann, P. (2006): Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12:826–836.
- Poirel, L., Bonnin, R.A., Nordmann, P. (2011): Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *Critical Review*, 63(12):1061–1067.
- Pour, N.K., Dusane, D.H., Dhakephalkar, P.K., Zamin, F.R., Zinjarde, S.S., Chopade B.A. (2011): Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62:328–338.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006): *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:39.
- Prakasam, G., Bhashini, M., LakshmiPriya, Ramesh, S.S. (2014): *In vitro* antibacterial activity of some essential oils against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian Journal of Medicinal Microbiology*, 32:90-91.
- Prashanth, K., Vasanth, T., Saranathan, R., Makki, A.R., Pagal, S. (2012): Antibiotic resistance, biofilms and quorum sensing in *Acinetobacter* species, Chapter 8; in: Pana, M. (ed.), *Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium*, InTech, 179-212.
- Quan, S., Hiniker, A., Collet, J.F., Baedwell, J.C.A. (2013): Isolation of bacteria envelope proteins, Chapter 22; in: Delcour, A.H. (ed.), *Bacterial Cell Surfaces: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 966, Springer Science+Business Media New York, USA; pp 359-366.
- Qian, M.D., Wu, X.C, Teng, Y., Zhao, W.P., Li, O., Fang, S.G., Huang, Z.H., Gao, H.C. (2012): Battacin (Octapeptin B5), a new cyclic lipopeptide antibiotic from *Paenibacillus tianmuensis* active against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3):1458–1465.
- Rahbar, M.R., Rasooli, I., Mousavi Gargari, S.L., Amani, J., Fattahian, Y. (2010): *In silico* analysis of antibody triggering biofilm associated protein in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Theoretical Biology*, 266:275–290.
- Rahimi, R., Ardekani, M.R. (2013): Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 19(1):73-79.
- Rahman, M., Kuhn, I., Rahman, M., Olsson-Liljequist, B., Mollby, R. (2004): Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of Gram-negative fermentative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4):2398-2403.
- Rai, M.K, Kon, K.V. (2013): Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10:775-790.
- Rajeshwari, U., Andallu, B. (2011): Medicinal benefits of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery*, 1(1): 51-58.
- Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., Menut, C., Andrianoeliso, H.S., Raherimandimby, M., Danthu, P. (2009): Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*, 114:680–684.
-

-
- Rao, R.S., Karthika, R.U., Singh, S.P., Shashikala, P., Kanungo, R., Jayachandran, S., Prashanth, K. (2008): Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian Journal of Medicinal Microbiology*, 26:333-337.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R. (2010): Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12):5062-5069.
- Rashid, M. H., Kornberg, A. (2000): Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*, 7:4885-4890.
- Rasooli, I., Shayegh, S., Astaneh, S. (2009): The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. *International Journal of Dental Hygiene*, 7(3):196-203.
- Rather, M.A., Dar, B.A., Sofi, S.N., Bhat, B.A., Qurishi, M.A. (2012): *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*, 1:22-32.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. (2000): Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1):3-12.
- Ray, A., Perez, F., Beltramini, A.M., Jakubowycz, M., Dimick, P., Jacobs, M.R., Roman, K., Bonomo, R.A., Salata, R.A. (2010): Use of vaporized hydrogen peroxide decontamination during an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection at a long-term acute care hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(12):1236-1241.
- Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2010): Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110:614-619.
- Ribera, A., Roca, I., Ruiz, J., Gibert, I., Vila, J. (2003): Partial characterization of a transposon containing the *tet(A)* determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52:477-480.
- Rickard, A. H., McBain, A. J., Stead, A. T., Gilbert, P. (2004): Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7426-7435.
- Rini, J.M. (1995): Lectin structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 24:551-577.
- Robenshtok, E., Paul, M., Leibovici, L., Fraser, A., Pitlik, S., Ostfeld, I., Samra, Z., Perez, S., Lev, B., Weinberger, M. (2006): The significance of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia compared with *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: risk factors and outcomes. *Journal of Hospital Infection*, 64:282-287.
- Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., Vila, J., (2012) The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace; *Frontiers in Microbiology*, 3:148-178.
- Roccaro, A.S., Blanci, A.R., Giuliano, F., Rusciano, R., Enea, V. (2004): Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:1968-1970.
- Roderic, D.M. (2001): Tree View 1.6.6. (www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html)
- Rodriguez-Bano, J., Marti, S., Soto, S., Fernandez-Cuenca, F., Cisneros, J.M., Pachon, J., Pascual, A., Martínez-Martínez, L., McQueary, C., Actis, L.A., Vila, J. (2008): Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: Associated features and clinical implications. *Clinical Microbiology and Infections*, 14:276-278.
- Rodrigues, F.M., Diniz-Filho, J.A.F., Bataus, L.A.M., Bastos, R.P. (2002): Hypothesis testing of genetic similarity based on RAPD data using Mantel tests and model matrices. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4):435-439.
-

-
- Rokvić, Lj. (2013): Uticaj zagađenosti staništa na fenolni profil i biološku aktivnost vrste *Rumex sanguineus* L. Master rad, PMF UNS, Novi Sad.
- Roller, S. (2003): Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Cambridge: Wood head Publishing, Limited.
- Romeo, T. (2008): Bacterial biofilms, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Rosato, A., Piarullil, M., Corbo1, F., Muraglia1, M., Carone, A., Vitali, M.E., Vitali, C. (2010): *In vitro* synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils. Current Medicinal Chemistry, 17:3289-3295.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., Milillo, M.A. (2007): Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. Phytomedicine, 14:727–732.
- Rosemberg, A.D., Wambold, D., Kraemer, L., Begley-Keyes, M., Zuckerman, S.L., Singh, N., Cohen, M.M., Bennett, M.V. (2008): Ensuring appropriate timing of antimicrobial prophylaxis. Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume, 90:226–232.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martinez, R.M., Sotomayor, J.A. Jordan, M.J. (2008): Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control, 19(7):681-687.
- Rowe-Magnus, D., Mazel, D. (2002): The role of integrons in antibiotic resistance gene capture materials. American Journal of Clinical Pathology, 62:807-811.
- Rowshan, V., Najafian, S., Tarakameh, A. (2012): Essential oil chemical composition changes affected by leaf ontogeny stages of myrtle (*Myrtus communis* L.). International Journal of Medical and Aromatical Plants, 2:114-117.
- Ruberto, G., Baratta, M.T., Deans, S.G., Dorman, H.J. (2000): Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. Planta Medica, 66:687-693.
- Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A. (1998): Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46:3741-3746.
- Ruiz, M., Marti S., Fernandez-Cuenca F., Pascual A., Vila J. (2007): Prevalence of IS(*AbaI*) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. FEMS Microbiology Letters, 274:63–66.
- Russell, A.D., Morris, A., Allwood, M.C. (1973): Methods for assessing damage to bacteria induced by chemical and physical agents. Methods in Microbiology, 8:95–182.
- Sadeghi-aliabadi, H., Emami, A., Saidi, M., Sadeghi, B., Jafarian, A. (2009): Evaluation of *in vitro* cytotoxic effects of *Juniperus foetidissima* and *Juniperus sabina* extracts against a panel of cancer cells. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8(4):281-286.
- Saghi, H., Bahador, A., Esmaili, D. (2014): Study of inhibition of *aphA-6* gene in *Acinetobacter baumannii* by satireja and thyme essence with RT-PCR technique. The International Journal of Biotechnology, 3(9):115-122.
- Saleh, F.M., Saleh, G.M. (2015): Biofilm formation and antibiotic susceptibility for clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. World Journal of Experimental Biosciences, 3:1-5.
- Samojlik, I., Lakić, N., Mimica-Dukić, N., Đaković-Švajcer, Božin, B. (2010): Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 58:8848–8853.
- Sandasi, M. (2008): The effect of plant extraction on microbial biofilm formation and development. Msc dissertation, Tshwane University of Technology.
-

-
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M. (2011): Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms *in vitro*. South African Journal of Botany, 77:80–85.
- San Feliciano, A, Gordaliza, M., Miguel Del Corral, J.M., Castro, M.A., Garcia-Gravalos, M.D., Ruiz-Lazaro, P. (1993): Antineoplastic and antiviral activities of some cyclolignans. Planta Medica, 59: 246-249.
- Sawamura, M. (2000): Aroma and functional properties of Japanese yuzu (*Citrus junos* Tanaka) essential oil. Aroma Research, 1:14-19.
- Sayyah, M., Nadjafnia, L., Kamalinejad, M. (2004): Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 94(2-3):283-287.
- Scalbert, A. (1991): Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30(12):3875–3883
- Scora, R.W. (1973): Essential leaf oil variability in green, variegated and albino foliage of *Myrtus communis*. Phytochemistry. 12:153–155.
- Sechi, L.A., Karadenizli, A., Deriu, A., Zanetti, S., Kolayli, F., Balikci, E., Vahaboglu, H. (2004): PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Medical Science Monitor, 10:180-184.
- Seifet, H., Boullion, B., Schulze, A., Pulverer, G. (1994): Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. Infection Control and Hospital Epidemiology, 15:520-528.
- Seward, R.J., Lambert, T., Towner, K.J. (1998): Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. Journal of Medicinal Microbiology, 47:455-462.
- Seward, R.J., Towner, K.J. (1999): Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. Clinical Microbiology Infection, 5:308–318.
- Shahat, A.A., Ibrahim, A.Y., Hendawy, S.F., Omer, E.A., Hammouda, F.M., Abdel-Rahman, F.H., Saleh, M.A. (2011): Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. Molecules, 16:1366-1377.
- Shahverdi, A.R., Monsef-Esfahani, H.R., Tavasoli, F., Zaheri, A., Mirjani, R. (2007): Transcinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* *in vitro*. Journal of Food Sciences, 72:S55–58.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007): The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International Journal of Food Microbiology, 117:112-119.
- Shanjani, P.S., Mirza, M., Calagari, M., Adams, R.P. (2010): Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa*. Industrial Crops and Products, 32:83–87.
- Sharon, N. (1977): Lectins. Scientific American, 236:108-119.
- Sharon, N. (1987): Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. FEBS Letters, 217(2):145-157.
- Shen, S., Samaranyake, L. P., Yip, H. K. (2005): Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. Archives of Oral Biology, 50(1):23-32.
- Sherry, E., Boeck, H., Warnke, P.H. (2001): Topical application of a new formulation of eucalyptus oil phytochemical clears methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. American Journal of Infection Control, 29:346.
- Shieh, J.C. (1996): Yields and chemical components of essential oils in *Eucalyptus camaldulensis* leaves. Taiwan Journal of Forest Sciences, 11:149–157.
- Shinkafi, S.A., Dauda, H. (2013): Antibacterial activity of *Allium cepa* (Onion) on some pathogenic bacteria associated with ocular infections. Scholars Journal Applied Medical Sciences, 1(3):147-151.
- Shiwani, S., Kumar Singh, N., Hyeon Wang, M. (2012): Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. Nutrition Research and Practice, 6(5):389-395.
-

-
- Shohaye, M., Abdel-Hameed, E.S.S., Bazaid, S.A., Maghrabi I. (2014): Antibacterial and antifungal activity of *Rosa damascena* MILL. essential oil, different extracts of rose petals. *Global Journal of Pharmacology*, 8(1):01-07.
- Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Pastuszka, M., Bienias, W., Kowalczyk, E. (2013): The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*, 18:9334-9351.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B. (1994): Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269:8022–8028.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B. (1995): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews*, 59:201–222.
- Sikkema, J., Poolman, B., Konings, W.N., de Bont, J.A.M. (1992): Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *Journal of Bacteriology*, 174:2986–2992.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L., Matos, F.J.A. (2003): Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 89:277–283.
- Silver, S., Wendt, L. (1967): Mechanism of action of phenethyl alcohol: breakdown of the cellular permeability barrier. *Journal of Bacteriology*, 93:560–566.
- Simin, N. (2014): Sekundarni biomolekuli u vrstama *Allium* sect. *Codonoprasum* Rchb. – biološke aktivnosti, fitohemijski i hemotaksonomski aspekti. Doktorska disertacija, PMF UNS, Novi Sad.
- Simões, L., Simões, M., Vieira, M. (2008): Intergeneric coaggregation among drinking water bacteria: evidence of a role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a bridging bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:1259-1263.
- Simon, J.E., Morales, M.R., Phippen, W.B., Vieira, R.F., Hao, Z. (1999): Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In: Janick, J. (ed.) *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA., 499–505.
- Siroy, A., Molle, V., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Pestel-Caron, M., Cozzone, A.J., Jouenne, T., De, E. (2005): Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:4876–4883.
- Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. (1995): Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2384-2388.
- Slavnić, Ž. (1972): Rod *Rumex* L. U: Josifović, N. (ur.) *Flora SR Srbije III*. SANU Beograd, 73-77.
- Smith, M.G., Gianoulis, T.A., Pukatzki, S., Mekalanos, J.J., Ornston, L.N., Gerstein, M., Snyder, M. (2007): New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & development*, 21(5):601-614.
- Soltanipour, M. (1999): Final report of collection and identification of medicinal plants from Hormozgan province. Deputy of education and research of Jahad-e-Keshvarzi (Iranian Agricultural) Ministry.
- Sonboli, A., Babakhani, B., Mehrabian, A.R. (2006): Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift für Naturforschung C. Journal of Biosciences*, 61(3–4):160–164.
- Spence, R.P., van der Reijden, T.J.K., Dijkshoorn, L., Towner, K.J. (2004): Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from United Kingdom hospitals with predominant northern European genotypes by amplified-fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2):832–834.
- Srinivasan, V.B., Rajamohan, G., Gebreyes, W.A. (2009): The role of novel efflux pump AbeS, member of the SMR family transporters in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents and Chemother*, 53:5312-5316.
- Srisukh, V., Tribuddharat, C., Nukoolkarn, V., Bunyapraphatsara, N., Chokephaibulkit, K., Phoomniyom, S., Chuanphung, S., Srifuengfung, S. (2012): Antibacterial activity of essential oils from *Citrus hystrix* (makrut lime) against respiratory tract pathogens. *ScienceAsia*, 38:212–217.
-

-
- Stahl-Biskup, E., Saez, F. (2002): Thyme, the genus *Thymus*. Taylor and Francis, London, UK, 330-331.
- Stanojević, R., Boža, P. (1984): Novo zabeležene biljke u flori Titelskog brega. Zbornik radova PMF-a, serija za biologiju, 14:61-68.
- Stapleton, P.D., Shah, S., Anderson, J.C., Hara, Y., Hamilton-Muller, J.M., Taylor, P.V. (2004): Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. International Journal of Antimicrobial Agents, 23(5):462-467.
- Stassi, V., Verykokidou, E., Loukis, A., Harvala, C., Philianos, S. (1996): The antimicrobial activity of the essential oils of four *Juniperus* species growing wild in Greece. Flavour and Fragrance Journal, 11:71-74.
- StatSoft, Inc. (2011): STATISTICA (data analysis software system), Version 10; Tulsa, USA.
- Stepanović, S., Vuković, D., Davić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. (2000): A modified microtitar palte test for quantification of staphylococcal biofilm formation, Journal of Microbiological Methods, 40:175-179.
- Stojanović, B. (2010): Mehanizmi rezistencije na peniciline i cefalosporine, Zavod za javno zdravlje Leskovac, Srbija.
- Stojković, D., Glamoclija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Siljegović, J., Soković, M. (2013): Investigation on bacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. Archiv of Biological Sciences, 65(2):639-643.
- Stokes, H.W., Hall, R.M. (1989): A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Molecular Microbiology, 3:1669-1683.
- Soni, K.A., Oladunjoye, A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., Silva, J.L., Mikel, B., Bailey, R.H. (2013): Inhibition and inactivation of *Salmonella typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. Journal of Food Protection, 76(2):205-212.
- Su, X.Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. (2005): AbeM, an H⁺- coupled *Acinetobacter baumannii* multi-drug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 49:4362-4364.
- Suh, H.J., Lee, K.S., Kim, S.R., Shin, M.H., Park, S., Park, S. (2010): Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 102-107.
- Sumbul, S., Ahmad, M., Asif, M., Akhtar, M. (2011): *Myrtus communis* Linn. a review. Indian Journal of Natural Products and Resources, 2(4):395-402.
- Sutherland, R., Slocombe, B., Rolinson, G.N. (1964): Development *in vitro* of bacterial cross-resistance involving penicillins, chloramphenicol and tetracycline. Nature, 203:548-549.
- Svirčev, E. (2014): Ispitivanja odabranih predstavnika podfamilije Polygonoideae (Polygonaceae A.L. de Jussieu 1789) sa područja centralnog i zapadnog Balkana. Fitohemijski i biohemijski aspekti. Doktorska disertacija, PMF UNS, Novi Sad.
- Synergy Software KaleidaGraph, Version 4.0, 2457 Perkiomen Avenue, PA 19606 USA.
- Szczepanski, S., Lipski, A. (2014): Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. Food Control, 36:224-229.
- Taherikalani, M., Maleki, A., Sadeghifard, N., Mohammadzadeh, D., Soroush, S., Asadollahi, P., Asadollahi, K., Emaneini, M. (2011): Dissemination of class 1, 2 and 3 integrons among different multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals, Iran. Polish Journal of Microbiology, 60(2):169-174.
-

-
- Tam, V.H., Schilling, A.N., Vo, G., Kabbara, S., Kwa, A.L., Wiederhold, N.P., Lewis, R.E. (2005): Pharmacodynamics of polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:3624–3630.
- Tatić, B. (1975): *Fam. Alliaceae* J.G. Agardh. 1858. U: Josifović, M. (ur.): *Flora SR Srbije VII*. SANU Beograd, 568-592.
- Tay, S.B., Yew, W.S. (2013): Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting Gram-negative bacterial pathogen. *Journal of Molecular Science*, 14(8):16570-16599.
- Thomson Coon, J., Ernst, E. (2003): Herbal medicinal products for the treatment of hypercholesterolemia: systematic review. *Perfusion*, 16:40-55.
- Thomson, W.A.R. (ed.) (1978): *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill Book Co., Maidenhead, United Kingdom.
- Tian, H., Lai, D.M. (2006): Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. *Zhong Yao Cai.*, 29(9): 920-921.
- Tisserand, R., Young, R. (2014): *Essential Oil Safety: A guide for health care professionals*. Elsevier Health Sciences, USA.
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., Actis, L.A. (2003): Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*, 149(12):3473-3484.
- Tomović, G., Niketić, M., Zlatković, B., Vukojičić, S., Stevanović, S. (2006): New floristic records in the Balkans 2. *Phytologia Balcanica*, 12(2):298-299.
- Towner, K. (2006): Prokaryotes, Chapter 3.3.25.: The genus *Acinetobacter*, Springer 6: 746-758.
- Traub, W.H., Bauer, D. (1993): Immunobiology of *Acinetobacter baumannii* and genospecies 3, *Zentralblatt für Bakteriologie*. 279:244-258.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G. (2005): Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:2474–2478.
- Tsiri, D., Kretsi, O., Chinou, I.B., Spyropoulos, C.G. (2003): Composition of fruit volatiles and annual changes in the volatiles of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. growing in Greece, *Flavor and Fragrance Journal*, 18(3):244-247.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Inuma, M. (1996): Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 50:27–34.
- Tucakov, J. (1984): *Lečenje biljem*. Rad Beograd, 637–638.
- Tuberoso, C.I.G., Rosa, A., Bifulco, E., Melis, M.P., Atzeri, A., Pirisi, F.M., Dessi, M.A. (2010): Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry*, 123:1242–1250.
- Tumen, I., Suntar, I., Keles, H., Akkol E.K. (2011): A therapeutic approach for wound healing by using essential oils of *Cupressus* and *Juniperus* species growing in Turkey. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:1-7
- Tunali, T., Yarat, A., Yanardağ, R., Özçelik, F., Özsoy, O., Ergenekon, G., Emekli, N. (1999): Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) on the skin of STZ induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 13(2):138-141.
- Turton, J.F., Kaufmann, M.E., Glover, J., Coelho, J.M., Warner, M., Pike, R., Pitt, T.L. (2005): Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:3074–3082.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (1972): *Flora Europea III*. Cambridge University Press, UK, 171-172.
-

-
- Tyagi, A.K., Malik, A. (2011): Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126:228–235.
- Ugulu, I., Baslar, S., Yorek, N., Dogan, Y. (2009): The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5):345-367.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. (2002): The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1561–1568.
- Vagi, E., Simandi, B., Suhajda, A., Hethelyi, E. (2005): Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* 38:51–57.
- Vahaboglu, H., Ozturk, R., Aygun, G., Coskuncan, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioglu, H., Balik, I., Aydin, K., Otkun, M. (1997): Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41:2265–2269.
- Vahaboglu, H., Hall, L.M., Mulazimoglu, L., Dodanli, S., Yildirim, I., Livermore, D.M. (1995): Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *Journal of Medical Microbiology*, 43:294–299.
- Vakili, E., Amjad, L., Karbasizade, V. (2013): Antibacterial properties of *Anthemis gayana* leaves essential oil. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(13):1464-1467.
- Valentini, G., Maggi, F., Bellomaria, B., Manzi A. (2003): The leaf and female cone oils of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus* and *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Sibth. et Sm.) Ball. from Abruzzo. *Journal of Essential Oil Research*, 15:418–421.
- Vandeputte, O.V., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., El Jaziri, M., Baucher M. (2010): Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1):243–253.
- van Handel, E. (1985): Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of American Mosquito Control Association*, 1:302-304.
- Vaneechoutte, M., Elaichouni, A., Maquelin, K., Claeys, G., Van Liedekerke, A., Louagie, H., Verschraegen, G., Dijkshoorn, L. (1995): Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction and cell envelope protein electrophoresis for analysis of *Acinetobacter baumannii* and *A. junii* outbreaks. *Research in Microbiology*, 146:457–465.
- Vanhaecke, E., Pijck, J. (1988): Bioluminescence assay for measuring the number of bacteria adhering to the hydrocarbon phase in the BATH test. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6):1436-1439.
- Van Pelt, A.W.J., Weerkamp, A.H., Uyen, M.H., Busscher, H.J., de Jong, H.P., Arends, J. (1985): Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Applied and Environmental Microbiology*, 49:1270–1275.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler, M.E. (2009): *Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 34:1234-1239.
- Vashist, J., Tiwari, V., Das, R., Kapil, A., Rajeswari, M.R. (2011): Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *Indian Journal of Medical Research*, 133:332-338.
-

-
- Veldhuizen, E.J.A., Tjeerdsma-Van Bokhoven, J.L.M., Zweijtzer, C., Burt, S.A., Haagsman, H.P. (2006): Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 1874–1879.
- Vera, R.R., Chane-Ming, J. (1999): Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chemistry*, 66:143-145.
- Veras, H.N.H., Rodrigues, F.F.G., Colares, A.V., Menezes, I.R., Coutinho, H.D., Botelho, M.A., Costa, J.G. (2012): Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippa sidoides* and thymol. *Fitoterapia*, 83:508-512.
- Verma, P., 2007. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. In: Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C. (eds.) *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. CRC Press, 275-299.
- Vidaković, M (1982): Četinjače morfologija i varijabilnost. Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Sveučilišna naklada Liber, Zagreb, SFRJ.
- Vidrich, V., Michelozzi, M., Franci, M., Fusi, P. (1992): Essential oils from Italian forest biomass. In *Biomass for Energy and Industry*, Hall DO, Grassi, G., Scheer, H. (eds). Proceedings of the 7th International EC Conference, Firenze, 1199–1203.
- Vijaya, K., Ananthan, S. (1996): Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58:191–193.
- Vila, J., Pachon, J. (2008): Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*, 9:587-599.
- Vila, J., Ruiz, J., Goni P., Marcos, A., de Anta, T.J. (1997): Quinolone resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39:757-762.
- Vila, J., Ruiz, J., Goni P., Marcos, A., de Anta, T.J. (1995): Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:1201-1203.
- Vincent, J., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K. (2009): International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 302:2323-2329.
- Wagner, G.J. (1996): Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*, 96:675–679.
- Wagner, H., Bladt, S. (2001): *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer: Berlin, Germany.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. (2009): Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16:97–110.
- Wang, H.X., Ng, T.B. (1999): Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sciences*, 65:2663-2677.
- Wannes, W.A, Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M.B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M.E., Marzouk, B. (2010): Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48:1362–1370.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., Thubthimthed, S. (2005): Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76:233–236.
- Warnke, P.H., Sherry, E., Russo, P.A., Açil, Y., Wiltfang, J., Sivananthan, S., Sprengel, M., Roldàn, J.C., Schubert, S., Bredee, J.P., Springer, I.N. (2006): Antibacterial essential oils in malodorous cancer patients: clinical observations in 30 patients. *Phytomedicine*, 13:463–467.
- Warnke, P.H., Sherry, E., Russo, P.A., Sprengel, M., Açil, Y., Bredee, J.P., Schubert, S., Wiltfang, J., Springer, I. (2005): Antibacterial essential oils reduce tumor smell and inflammation in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 23:1588–1589.
-

-
- Williams, C. (2011): Medicinal Plants in Australia Volume 2: Gums, Resins, Tannin and Essential Oils. Rosenberg Publishing Pty Ltd, Australia, 77-79.
- Winn, Jr W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Schreckenberger, D.C., Procop, G.W., Woods, G.L. (2005): Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B. (2004): Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical and Infectious Diseases*, 39:309–317.
- Wroblewska, M.M., Dijkshoorn, L., Marchel, H., van den Barselaar, M., Swoboda-Kopec, E., van den Broek, P.J., Luczak, M. (2004): Outbreak of nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii* in neurosurgical patients. *Journal of Hospital Infection*, 57:300–307.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B.P., Pei, R.S., Xu, N. (2008): The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters of Applied Microbiology*, 47:174–179.
- Yamamoto, S., Okujo, N., Sakakibara, Y. (1994): Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arcchiv de Microbiologia*, 162:249–254.
- Yap, P.S.X., Yiap, C.B., 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.
- Yildirim, A., Mavi A., Kara A.A. (2001): Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 49:4083-4089.
- Yoda, Y., Hu, Z.Q., Zhao, W.H. Shumamura, T. (2004): Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10:55-58.
- Yong, D., Shin, J.H., Kim, S., Lim, Y., Yum, J.H., Lee, K., Chong, Y., Bauernfeind, A. (2003): High prevalence of PER-1 extended-spectrum betalactamase- producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:1749–1751.
- Zaika, L.L. (1988): Spices and herbs: their antibacterial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 23:97-118.
- Zanetti, S., Cannas, S., Molicotti, P., Bua, A., Cubeddu, M., Porcedda, S., Marongiu, B., Sechi, L.A. (2010): Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium* spp. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1–4.
- Zarrilli, R., Crispino, M., Bagattini, M., Barretta, E., Di Popolo, A., Triassi, M., Villari, P. (2004): Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 946-953.
- Zhang, D., Hu, H., Rao, Q., Zhao, Z. (2011): Synergistic effects and physiological responses of selected bacterial isolates from animal feed to four natural antibacterials and two antibiotics. *Foodborne Pathogens Diseases*, 8:1055–62.
- Zhang, H., Chen, F., Wang, X., Yao, H.Y. (2006): Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*, 39:833–839.
- Zhao, W.H., Asano, N., Hu, Z.Q., Shimamura, T. (2003): Restoration of antibacterial activity of betalactams by epigallocatechin gallate against beta-lactamase-producing species depending on location of beta-lactamase. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, 55:735–740.
- Zhao, X., Xu, C., Domagala, J., Drlica, K. (1997): DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94:13991–13996.
-

Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J., Yan, W. (2007): The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food-borne pathogen *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Safety*, 27:124–133.

Ziment, I. (2000): Recent advances in alternative therapies. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 6:71-78.

Zoubiri, S., Baaliouamer, A., Seba, N., Chamouni, N. (2014): Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(4):480–485.

<http://allium.wdfiles.com/local--files/allium-f/Allium%20fuscum.jpg>

http://calphotos.berkeley.edu/imgs/512x768/0000_0000/0309/0034.jpeg

http://cdn2.bigcommerce.com/server3300/c93be/product_images/uploaded_images/thyme-live.jpeg

<http://fitoapteka.org/images/foto/800/17.jpg>

http://lh4.ggpht.com/_rWksMjEBTQk/Sa1LhKKy1aI/AAAAAAAAAJ-M/aUjLZ-laKqc/s800/leo-mic-Coriandrum-sativum-390.jpg

http://luirig.altervista.org/cpm/albums/bot-units01/mentha-piperita-f_-rubescens8222.jpg

<http://luirig.altervista.org/cpm/albums/bot-units34/satureja-hortensis30648.jpg>

http://online-media.uni-marburg.de/biologie/nutzpflanzen/bilder/vb/37a03_foeniculum_vulgare.jpg

http://pharmacy63.cade.uic.edu/pharmacy/garden/plantPhotos/45_2.jpg

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/Thymus_serpyllum_kz1.jpg

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/21/Juniperus_oxycedrus_subsp._oxycedrus_\(fruits\).jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/21/Juniperus_oxycedrus_subsp._oxycedrus_(fruits).jpg)

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/Petroselinum.jpg>

http://www.agrovizija.rs/cutenews/data/upimages/lekovito_maticnjak2.jpg

http://www.awl.ch/heilpflanzen/artemisidracunculus/estragon_2.jpg

<http://www.biolib.cz/IMG/GAL/42719.jpg>

<http://www.botansad.com.ua/images/phocagallery/dendrologia/juniperus%20excelsa.jpg>

<http://www.conifers.org/cu/ju/sabina2.jpg>

<http://www.cretanflora.com/images/Origanum%20vulgare%20ssp.%20hirtum.jpg>

http://www.cretanflora.com/origanum_vulgare.html

http://www.floradecanarias.com/imagenes/eucalyptus_camaldulensis2.jpg

http://www.florasilvestre.es/mediterranea/Cupressaceae/Juniperus_phoenicea.jpg

<http://www.florum.fr/img/R/9/5/6899-Rumex-sanguineus.jpg>

<http://www.ihervalstore.com/wp-content/uploads/2014/02/Origanum-Majorana11.jpg>

http://www.missouriplants.com/Others/Allium_sativum_plant.jpg

http://www.pharmakobotanik.eu/systematik/7_bilder/liebermn/Lb-00602.jpg

<http://www.plantoftheweek.org/image/myrtus.jpg>

http://www.plantsystematics.org/users/jdelaet/11_10_08_8/oeploa741/nDSC_6663.JPG

<http://www.survivalplantsmemorycourse.com/wp-content/uploads/2012/11/plant22.jpg>

http://www.titelskibreg.com/UserFiles/Image/titelskibreg/220px-Achillea_millefolium_vallee-de-grace-amiens_80_22062007_1.jpg

<http://www.uniprot.org/uniprot/P62579>

<http://www.wildgingerfarm.com/images/LadyLavender001.JPG>

https://c2.staticflickr.com/8/7084/6994881120_3b2567a124.jpg

<https://www.rightplants4me.co.uk/sites/rightplants4me.co.uk/files/photo/Allium~onions%20in%20flower%20pink%20&%20white>

9. PRILOZI

Prilog 9.1. Preporučena primena etarskih ulja u trudnoći
(preuzeto i modifikovano iz Braun i Choen, 2010)

Smatraju se bezbednim	Bezbedna su za spoljnu upotrebu	Koristiti ih pažljivo	Izbegavati ih*
- <i>Elettaria cardamomum</i>	- <i>Pimpinella anisum</i>	- <i>Artemisia dracunculus</i>	- <i>Cinnamomum camphora</i>
- <i>Anthemis nobilis</i> (ili <i>Chamaemelum nobile</i>)	- <i>Foeniculum vulgare</i>	- <i>Santolina chamaecyparissus</i>	- <i>Hyssopus officinalis</i>
- <i>Matricaria recutita</i> (ili <i>Matricaria chamomilla</i>)	- <i>Lavandula angustifolia</i>	- <i>Evernia prunastri</i>	- <i>Anethum sowa</i>
- <i>Salvia sclarea</i>	- <i>Lavandula x intermedia</i> (<i>Lavandula hybrida</i>)	- <i>Perilla frutescens</i>	- <i>Juniperus pfitzeriana</i>
- <i>Coriandrum sativum</i>	- <i>Lavandula stoechas</i>	- <i>Ruta graveolens</i>	- <i>Petroselinum crispum</i>
- <i>Pelargonium graveolens</i>	- <i>Rosmarinus officinalis</i>		- <i>Plectranthus sp.</i> (<i>Plectranthus barbatus</i>)
- <i>Zingiber officinale</i>	- <i>Achillea millefolium</i>		- <i>Salvia lavandulifolia</i>
- <i>Lavandula angustifolia</i>	- <i>Illicium verum</i>		- <i>Juniperus sabina</i>
- <i>Citrus aurantium</i>	- <i>Myristica fragrans</i>		
- <i>Cymbogen martinii</i>			
- <i>Pogostemon cablin</i>			
- <i>Citrus aurantium</i>			
- <i>Rosa damascena</i>			
- <i>Aniba rosaeodora</i>			
- <i>Santalum album</i>			
- <i>Citrus sinensis</i>			
- <i>Citrus reticulata</i>			

* ova etarska ulja sadrže komponente kamfor, apiol, safrol, sabinil acetat ili pinokamfon

Prilog 9.2. Toksičnost i preporučene doze etarskih ulja nekih biljnih vrsta (Lis-Balchin, 2006)

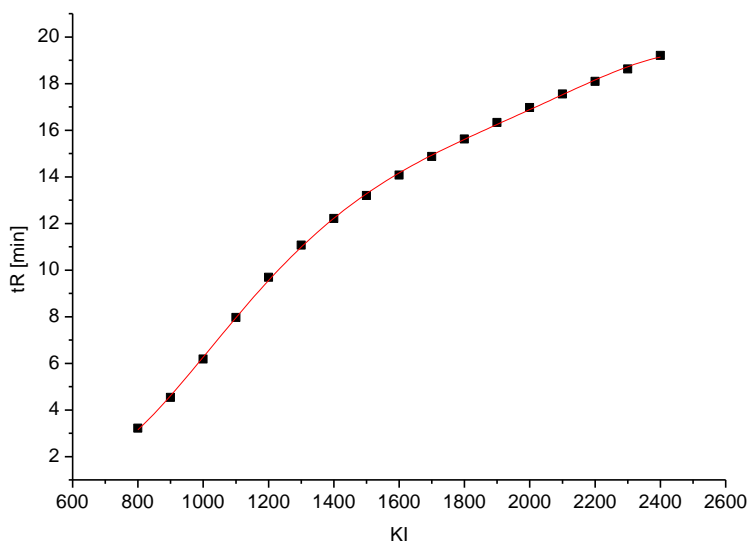
Etarsko ulje	Limit doze etarskog ulja* (%)	Akutna toksičnost etarskog ulja (g/kg telesne mase)		Test organizam		Doza ulja iritacije i/ili osetljivosti kod ljudi (%)	Komentar
		Dermalna LD ₅₀	Oralna LD ₅₀	Dermalno	Oralno		
<i>Ocimum basilicum</i>	4	>1,5	1,4 -<3,5	zec	pacov	>4	Komponenta estragol izaziva osetljivost.
<i>Eucalyptus</i> sp.	10	2,5	4,4	zec	pacov	>10	Prijavljena je hipersenzitivnost <i>E. globulus</i> i potencijalna osetljivost na <i>E. citadora</i> .
<i>Foeniculum vulgare</i> gorki	4	>3,8	>5	zec	pacov	>4	Nizak antibakterijski efekat ulja, a komponenta anetol poseduje karakteristike alergena.
slatki		>4,5	>5			>4	
<i>Juniperus communis</i>	ND	>5	>5-8	zec	pacov	≥8	LD ₅₀ za intraperitonealno injektiranje je 3 g/kg telesne mase miša.
<i>Lavandula angustifolia</i>	ND	>5	>5	zec	pacov	>10	Nema iritacije ili slaba iritacija ljudske i životinjske kože, ali može izazvati osetljivost kože
<i>Lavandula x intermedia</i>	ND	>5	>5	zec	pacov	>5	-
<i>Melaleuca leucadendron</i>	4	>5	>4	zec	pacov	>5	Nerazblaženo ulje može izazvati iritaciju mukoznih membrana
<i>Cinnamomum camphora</i> beli	20	>5	>5	zec	pacov	>20	Komponenta safrol učestvuje u karcinogenim aktivnostima i zato je tamniji kamfor potencijalno toksičan.
žuti		>4	>5			>4	
braon		2,5	4			>4	
<i>Juniperus</i> sp.	-	>5	>5	zec	pacov	>8	Nerastvoreno ulje uzrokovalo iritaciju kod 2/20 ljudi nakon izlaganja ulju u trajanju od 24 h.
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> grana	-	3,4	0,69	zec	pacov	<4	Komponenta cinamaldehyd izaziva iritaciju i osetljivost.
list		2,7	>5				
<i>Cymbopogon nardus</i>	1	3,4-6,7	>5	zec	pacov	>8	Moguća je iritacija i osetljivost.

<i>Syzygium aromaticum</i>								
pupoljak	4	>5	>2,7-3,7	zec	pacov	>5		20 % ovog ulja u kremi je kod 2/25 ljudi ispoljilo dermalnu iritaciju – eritem.
list	2	1,2	1,4			>5		
grana	4	>5	2-3,7			>10		
<i>Mentha arvensis</i>	8	>5	>1,2-2,9 3,1	zec	pacov miš	ND		Komponenta metol može iritirati oči i može biti štetna ako se ingestijom uvede u većoj količini.
<i>Piper cubeba</i>	8	>5	<5	zec	pacov	>8		-
<i>Cupressus sempervirens</i>	4	>5	>5	zec	pacov	>5		-
<i>Jasminum grandiflorum</i>	4	>5	>5	zec	pacov	>3		Može uticati na osjetljive ljude.
<i>Citrus limonum</i>	ND	>5	>5	zec	pacov	>10 i >100		Slaba antibakterijska aktivnost.
<i>Boswellia carterii</i>	8	>5	>5	zec	pacov	>8		Visok sadržaj limonena u nekim komercijalnim uljima može izazvati osjetljivost.
<i>Inula helenium</i>	0,1	ND	ND	ND	ND	ND		Etarko ulje i njegove komponente alantolakton i izoalantolakton izazivaju osjetljivost, a elekampan uzrokuje alergijski kontaktni dermatitis.
<i>Melissa officinalis</i>	4	ND	ND	-	-	ND		Dominantna komponenta citral može izazvati tenziju u očima majmuna nakon svakodnevnog primene u toku dve nedelje.
<i>Salvia sclarea</i>	8	-	-	-	-	>4		Prisustvo linalola u velikoj količini može uticati na pojavu sensitizacije.
<i>Origanum majorana</i>	4	-	-	-	-	-		Potentan antimikrobni agens ali izaziva iritaciju i nije prihvatljiv za površinsku primenu.

* preporučeni bezbedni limiti etarskog ulja od strane Istraživačkog instituta za aromatične materijale (eng. *Research Institute for Fragrance Materials (RIFM) recommended safety of use limits*); ND- nije dokumentovano

Prilog 9.3. Kalibracija za Kovats indekse

Jedinjenje	KI	t _R [min]
oktan	800	3,213
nonan	900	4,533
dekan	1000	6,18
undekan	1100	7,966
dodekan	1200	9,689
tridekan	1300	11,069
tetradekan	1400	12,209
pentadekan	1500	13,193
heksadekan	1600	14,073
heptadekan	1700	14,876
oktadekan	1800	15,625
nonadekan	1900	16,327
ikozan	2000	16,967
heneikozan	2100	17,553
dokozan	2200	18,091
trikozan	2300	18,624
tetrakozan	2400	19,206



Prilog 9.4. Kalibracija za Kovats indekse

Prilog 9.5. Procenat transmisije svetlosti podloga za obogaćenje nakon inkubacije od 24 i 48 h na temperaturi od 37 °C

Oznaka uzorka	Transmisija svetlosti (%)																	
	24 h									48 h								
	Ac	Al	E	Ph	H	La	Le	P	T	Ac	Al	E	Ph	H	La	Le	P	T
M	87	82	98	89	85	89	90	85	89	86	78	98	84	82	84	82	81	81
	*		*	*		*	*		*			*						
SR	87	77	89	88	72	87	86	90	87	85	62	72	74	62	85	85	84	85
			*	*			*	*	*									
BJ	88	84	87	90	85	90	90	86	86	88	81	86	89	84	89	88	84	85
	*		*	*		*	*		*	*		*	*		*	*		
DTD	88	84	87	86	85	86	87	85	88	76	66	82	81	82	83	85	81	83
D-N	83	81	85	81	67	77	97	78	77	82	62	67	54	60	72	86	74	54
							*											
D-Z	79	79	85	79	68	81	96	75	81	80	64	63	55	65	75	76	73	55
							*											
DP	83	83	87	84	86	86	86	80	86	85	85	85	83	82	85	85	80	81
DB	88	86	87	87	85	86	84	85	87	82	85	86	86	77	81	83	84	84
	*		*	*					*									
P1	88	89	89	90	89	89	88	99	92	88	89	89	89	82	84	87	85	82
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
P2	87	89	88	90	87	90	90	87	88	86	87	83	89	85	83	86	84	80
	*	*	*	*	*	*	*	*	*				*					
P3	89	89	88	89	89	88	89	88	88	88	87	87	88	86	88	89	86	85
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*		

* - vizuelno odsustvo rasta; ** - moguće greške prilikom merenja usled pojave taloga i u neinokulisanim podlogama sa tirozinom, što uzrokuje smanjenu transmisiju svetlosti

Prilog 9.6. Multipla rezistencija *A. baumannii*

<i>A. baumannii</i>		Rezistotip soja*
Izolati iz humanog patološkog materijala	Aba-2572	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^I -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^S -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-2793	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^S -SXT ^S -CTX ^R -CIP ^S -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-4156	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-4727	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-4779	AMK ^S -GEN ^S -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-4803	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^R -SXT ^I -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-4804	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^R -SXT ^I -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-4890	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-4914	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-5055	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-5074	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^S -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-5081	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-5372	AMK ^S -GEN ^S -KAN ^R -NET ^S -TOB ^S -SXT ^I -CTX ^R -CIP ^S -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-6673	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-7860	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^S -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-3496	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^I -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-4010	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^I -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-8255	AMK ^S -GEN ^S -KAN ^R -NET ^S -TOB ^I -SXT ^I -CTX ^R -CIP ^S -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-8781	AMK ^S -GEN ^S -KAN ^R -NET ^I -TOB ^I -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^S -TET ^S -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-8833	AMK ^S -GEN ^S -KAN ^R -NET ^S -TOB ^R -SXT ^I -CTX ^R -CIP ^S -TET ^S -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^I
Referentni sojevi	ATTC19606	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^S -NET ^S -TOB ^S -SXT ^S -CTX ^R -CIP ^S -TET ^S -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
	ATCCBAA747	AMK ^S -GEN ^S -KAN ^S -NET ^S -TOB ^S -SXT ^S -CTX ^R -CIP ^S -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
	NCTC 13423	AMK ^S -GEN ^S -KAN ^S -NET ^S -TOB ^S -SXT ^S -CTX ^R -CIP ^S -TET ^S -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
Izolati iz prirodne sredine	Aba-S-Ace	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-S-Tyr	AMK ^R -GEN ^S -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-DZ-Ace	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^R -SXT ^S -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-DN-Ace	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-M-Ace	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^S -SXT ^I -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^R
	Aba-DP-Phe	AMK ^R -GEN ^R -KAN ^R -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-DTD-Tyr	AMK ^S -GEN ^R -KAN ^R -NET ^S -TOB ^S -SXT ^I -CTX ^R -CIP ^R -TET ^R -PMB ^S -CHL ^R -IMP ^S
	Aba-B-Phe	AMK ^S -GEN ^S -KAN ^S -NET ^R -TOB ^R -SXT ^R -CTX ^R -CIP ^S -TET ^R -PMB ^R -CHL ^R -IMP ^R

*AMK-amikacin, GEN-gentamicin, KAN-kanamicin, NET-netilmicin, TOB-tobramicin, SXT-trimetoprim/sulfametoksazol, CTX-ceftriakson, CIP-ciprofloksacin, TET-tetraciklin, PMB-polimiksin B, CHL-hloramfenikol, IMP-imipenem, ^R-rezistentan, ^S-osetljiv, ^I-umereno osjetljiv

Prilog 9.7. Prisustvo oligonukleotidnih sekvenci u sekvenciranim genomima *A. baumannii* u NCBI bazi podataka

Br.	<i>A. baumannii</i> soj	Prajmeri*							
		Aba_bap		Aba_bla _{PER-1}		Aba_Int1		Aba_Int2	
		F	R	F	R	F	R	F	R
1	ATCC 17978	-	+	-	-	-	-	-	-
2	ACICU	-	+	-	-	-	+	-	-
3	AB307-0294	+	+	-	-	-	-	-	-
4	AB0057	-	-	-	-	-	-	-	-
5	AYE	+	+	-	-	+	+	-	-
6	D1279779	-	-	-	-	-	-	-	-
7	MDR-TJ	-	+	-	-	-	+	-	-
8	1656-2	-	+	+	+	-	+	-	-
9	TCDC-AB0715	-	+	-	-	-	+	-	-
10	MDR-ZJ06	-	+	-	-	-	+	-	-
11	TYTH-1	-	+	-	-	-	+	-	-
12	AC30	-	+	-	-	-	-	-	-
13	BJAB07104	-	+	-	-	-	-	-	-
14	BJAB0715	-	+	-	-	-	-	-	-
15	BJAB0868	-	+	-	-	-	-	-	-
16	ZW85-1	-	+	-	-	-	-	-	-
17	AC29	-	+	-	-	-	-	-	-
18	AB031	-	+	-	-	-	-	-	-
19	AB030	-	+	-	-	-	-	-	-
20	Ab120-A2	-	+	-	-	-	-	-	-
21	LAC-4	-	-	-	-	-	-	-	-
22	6411	-	-	-	-	-	-	-	-
23	6200	-	+	-	-	-	-	-	-
24	NCGM237	-	+	-	-	-	+	-	-
25	IOMTU433	-	+	-	-	-	-	-	-
26	A1	+	+	-	-	-	+	-	-
27	AB5075-UW	+	+	-	-	-	-	-	-
28	XH386	-	+	-	-	-	+	-	-
29	Ab04-mff	-	+	-	-	-	-	-	-
30	ATCC 17978-mff	-	+	-	-	-	-	-	-

* F - forward prajmer, R - reverzni prajmer, -- nedetektovana sekvenca, + - detektovana sekvenca

Prilog 9.8. Rezultati RAPD-PCR analize *A. baumannii* izolata

<i>A. baumannii</i>	Detektovani produkti*					Ukupno	Detektovani profili**				
	K-15	OPB-06	OPB-11	OPN-02	OPA-08		K-15	OPB-06	OPB-11	OPN-02	OPA-08
Aba-2572	1	3	3	3	3	13	b2	a1	b	b	a1
Aba-2793	5	1	1	5	2	14	b	a	c	c	b
Aba-4156	3	4	1	6	2	16	b1	a	c	c	b
Aba-4727	4	2	1	5	2	14	b1	a3	c	c	b
Aba-4779	5	1	1	2	2	11	b	a	c	d	b
Aba-4803	2	1	3	6	3	15	a1	b	d	e	a
Aba-4804	1	3	2	6	6	18	1	a1	d	e	c
Aba-4890	8	1	5	3	6	23	b1	a	c	c	f
Aba-4914	1	1	4	3	0	9	c	b	c1	b	g
Aba-5055	3	1	1	5	2	12	b	a	c	c	b
Aba-5074	7	2	2	6	2	19	b	a	c1	c2	b
Aba-5081	4	2	1	4	2	13	b1	a	c	d	b
Aba-5372	4	2	1	4	5	16	b1	a	c	c	f
Aba-6673	6	2	1	4	1	14	b	a	c	c	g
Aba-7860	6	4	2	4	2	18	b	a	c1	c	a2
Aba-8255	5	1	2	5	2	15	b	a	c1	c	b
Aba-8781	3	3	1	4	2	13	a	a2	a	b	b
Aba-8833	8	3	3	5	4	23	b	a2	a1	a	a
Aba-3496	1	2	6	2	4	15	c	a1	a3	b	c
Aba-4010	1	2	4	3	6	16	c	a1	a	b	e
ATCC 19606	3	3	3	2	2	13	f	a2	a2	b1	a1
ATCC BAA747	2	4	4	3	2	15	h	a1	a3	c1	b
NCTC13423	5	2	1	5	2	15	b1	a	c	c	b
Aba-B-Phe	1	2	6	2	5	16	d	c	e	b2	d
Aba-DP-Phe	4	2	7	3	1	17	d	c	e	b2	d1
Aba-DTD-Tyr	10	4	5	3	2	24	b	a2	c	f	c
Aba-DN-Ace	2	2	3	2	2	11	e	a1	c1	g	b
Aba-DZ-Ace	3	3	4	3	1	14	f	a2	a	b2	h
Aba-S-Ace	2	5	3	8	3	21	g	d	f	h	c
Aba-M-Ace	7	4	2	1	2	16	e	a2	c1	a	c1
Aba-S-Tyr	1	5	7	1	2	16	a	d	f	i	c1
Ukupno	118	77	90	118	82	485	11	7	10	13	11

*Broj detektovanih traka na gelovima; **Različiti RAPD-PCR fingerprintovi dobijeni primenom pet prajmera; detektovani profili su označeni slovima, gde su slični profili (razlika je u jednoj traci na gelu) označeni kao novi profil u čijem je nazivu pored slova dodat broj

Prilog 9.9. Hemijski sastav etarskih ulja biljaka iz porodice Lamiaceae i biljaka iz porodice Cupressaceae*

tR [min]	KI eksp	KI tabl	max	ID	tip	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Juniperus communis</i>				
													1	2	3	4	
3,87	850	856	0,4	Z-Salven	mono			0,45									
4,00	860	867	0,1	E-Salven	mono			0,09									
4,90	924		0,1	monoterpen	mono			0,10									
4,95	927	927	0,3	Triciklen	mono			0,30									
5,01	930	930	1,4	Tujen	mono	0,24	1,24	0,05					3,89	0,65	6,27	3,78	
5,14	938	939	14,0	α -Pinen	mono	0,58	1,20	6,83		0,27	0,85	0,71	42,47	72,28	21,00	18,41	
5,40	955	954	7,4	Kamfen	mono	0,13	1,40	7,44		0,40		0,44		0,60			
5,48	960	960	0,1	Tuja-2,4(10)-dien	mono			0,07									
5,79	979	975	16,3	Sabinen	mono	1,70					0,86		19,47	3,50	29,77	29,90	
5,82	982	979	2,3	1-Okten-3-ol	neterp		2,31		0,30	0,11		0,35					
5,87	984	979	10,3	β -Pinen	mono	9,09	0,37	1,09		0,29	1,84	0,13	2,44	3,39		2,01	
5,96	990	981	2,8	6-metil-5-hepten-2-on	neterp				2,84								
6,04	995	991	3,6	β -Mircen	mono	1,187	1,08	0,55	0,21	0,14	1,37	0,21	2,97	7,11	4,11	3,63	
6,32	1011	1003	0,9	α -Felandren	mono		0,19	0,11									
6,42	1014	1008	0,6	δ -3-Karen	mono								4,37	1,00			
6,54	1023	1017	11,0	α -Terpinen	mono		1,68	0,21			0,13	0,48	1,93	0,36	1,52	1,13	
6,68	1030	1025	8,1	<i>p</i> -Cimen	mono	0,13	8,10	1,08		0,38		29,46	2,20		7,61	2,60	
6,75	1034	1029	4,8	Limonen	mono	0,53	0,19	1,94		0,36	0,63	0,54	3,04	1,65	6,37	14,89	
6,77	1035	1030	9,2	β -Felandren	mono	0,92	0,21										
6,83	1038	1031	44,4	1.8-Cineol	mono	0,14	0,22	14,57		10,94	15,67	0,87					
7,05	1051	1050	0,7	<i>trans</i> - β -Ocimen	mono	0,20			0,17		0,61						
7,28	1063	1060	32,5	γ -Terpinen	mono	0,55	8,70	0,22			0,25	1,54	3,48	0,54	3,73	1,86	
7,45	1072	1070	3,3	<i>cis</i> -Sabinen hidrat	mono		0,54			0,13	0,22						
7,53	1076	1073	1,0	Linalol oksid, <i>trans</i> , furanoid	mono					1,00							
7,82	1092	1087	0,8	Linalol oksid, <i>cis</i> , furanoid	mono					0,78							
7,83	1092	1089	4,2	α -Terpinolen	mono	0,16	0,20				0,22		1,87	0,50	2,17	1,91	
7,85	1094	1091	2,4	<i>p</i> , α -Dimetilstiren (<i>p</i> - Cimemen)	mono			0,22									
7,94	1098		1,1	Rozefuran	mono				1,07								
7,99	1102	1097	73,5	Linalol	mono	0,95	2,54	0,45	0,38	21,21	35,83	2,41					

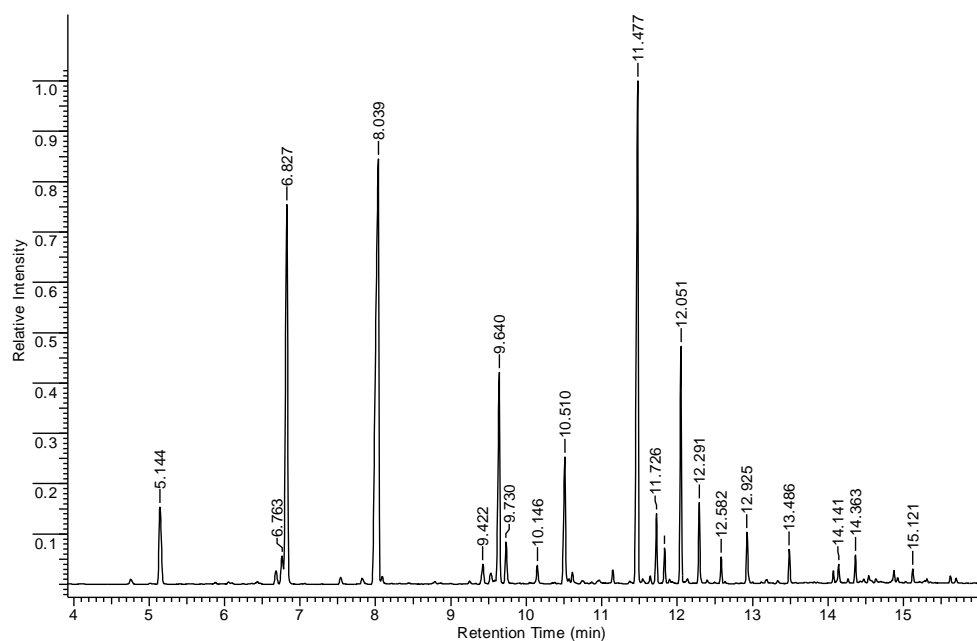
8,16	1111	1102	23,9	<i>cis</i> -Tujon (α -Tujon)	mono	0,27	23,95	0,97											
8,38	1124	1114	5,3	<i>trans</i> -Tujon (β -Tujon)	mono		5,34												
8,46	1129		0,1	NI			0,11												
8,53	1133	1126	0,1	α -Kamfonelal	mono		0,10												
8,68	1142		0,1	monoterpen	mono		0,07												
8,76	1146		0,2	monoterpen	mono			0,20											
8,76	1146	1142	0,3	<i>cis</i> -Sabinol / <i>trans</i> -Sabinol	mono														
8,76	1146	1140	0,4	Norpinon	mono	0,36													
8,80	1148	1139	0,2	<i>trans</i> -Pinocarveol	mono	0,23	0,11												
8,81	1149		0,2	monoterpen	mono			0,16											
8,90	1154	1146	17,9	Kamfor	mono	0,39	17,92	14,31	0,43	0,48									
8,95	1157	1153	2,0	Citronelal	mono			1,99											
9,03	1162	1153	41,1	Menton	mono			1,49	0,89										
9,09	1165		1,1	mirtenil acetat-like	mono	1,13													
9,14	1168	nema	1,3	monoterpen	mono			1,31											
9,17	1170	1163	2,2	<i>trans</i> -Pinokamfon (<i>trans</i> -3-Pinanon)	mono	2,18													
9,20	1172	1165	1,3	Lavandulol	mono			1,33											
9,21	1172	1169	0,3	Tujol (3-Tujanol)	mono		0,30												
9,21	1172	1163	11,9	Izomenton	mono			0,32											
9,21	1172	1165	0,6	Pinokarvon	mono	0,62													
9,24	1174	1169	4,9	Borneol	mono	4,13	3,72	4,89	0,98	1,51									
9,32	1179	1174	0,2	Linalol oksid, <i>cis</i> , piranoid	mono			0,18											
9,33	1179	1172	19,1	Mentol	mono				0,54	0,24									
9,33	1179	1173	1,4	Rosefuran epoksid	mono			1,41											
9,41	1184	1175	50,7	<i>cis</i> -Pinokamfon (Izopinokamfon)	mono	50,73													
9,42	1184	1177	23,3	Terpinen-4-ol	mono	0,75	0,41	0,86	0,37	1,25	4,85	9,67	4,52						
9,44	1185	1177	2,2	E-Izocitral	mono			2,16											
9,53	1191	1183	0,4	p-Cimen-8-ol	mono		0,07	0,37		0,24									
9,56	1192	1191	0,4	Heksil butanoat	neterp			0,35											
9,63	1196	1189	4,0	α -Terpineol	mono	0,45	0,13	1,08	1,85	0,28									
9,74	1203		0,1	NI			0,11												
9,74	1204	1196	4,0	Mirtenol	mono	4,00													
9,74	1204	1196	0,3	Mirtenal	mono			0,20											

12,09	1389	1377	0,3	α -Kopaen	seskvi	0,14		0,29	0,23		0,11	1,23	0,36	0,40	
12,12	1392	1382	0,2	Daucen	seskvi					0,20					
12,14	1394	1385	0,1	E- β -damascenon	seskvi				0,12						
12,20	1399	1388	3,7	β -Bourbonen	seskvi	2,04		0,04							
12,24	1403	1391	0,6	β -Elemen	seskvi						0,55	0,55	0,38	0,61	1,33
12,29	1408	1404	72,3	Metil-eugenol	fen	0,76	0,56		0,27		0,59				
12,34	1413	1413	0,2	<i>cis</i> - α -Bergamoten	seskvi					0,21					
12,38	1417			sesquiterpene	seskvi										0,48
				Z-Kariofilen											
12,44	1423	1409	0,1	(Izokariofilen)	seskvi			0,05							
12,46	1426	1413	0,3	α -Z-Farnesen	seskvi					0,26	0,10				
12,47	1426	1410	0,6	α -Gurjunen	seskvi	0,61									
12,49	1428	-	0,3	monoterpen	mono				0,31						
12,53	1432	1418	1,4	α -Santalen	seskvi					1,35					
12,58	1437	1419	14,6	<i>trans</i> - β -Kariofilen	seskvi	1,85	2,51	2,01	14,63	1,74	0,30	1,36	0,68	1,88	0,54
12,66	1446	1432	0,2	<i>beta</i> -Kopaen	seskvi	0,22	0,18	0,04							0,29
12,68	1448	1423	7,2	<i>trans</i> - α -Bergamoten	seskvi					0,54	7,23				
12,73	1453	1440	0,4	α -Guaien	seskvi						0,43				
12,78	1458	1441	0,2	Aromadendren	seskvi			0,22		0,12					
12,82	1462	1457	0,5	E- β -Farnesen	seskvi				0,25	0,32	0,54				
12,82	1462	nema	0,3	sesviterpen	seskvi	0,28									
12,87	1467	nema	0,1	NI				0,08							
12,87	1467	1460	0,2	Sesquisabinen	seskvi					0,22					
12,93	1473	1452	3,6	α -Humulen	seskvi	0,39	0,13	3,62	1,15	0,30	0,80	0,66	1,42	0,37	0,71
13,00	1480	1460	2,0	<i>allo</i> -Aromadendren	seskvi	2,01		0,13	0,11						
				Murola-4(14),5-dien/ Bicikloeskvielandren	seskvi						0,66				
13,11	1492	1480	0,4	γ -Murolen	seskvi	0,12	0,35	0,30							
13,12	1492	1481	2,9	ar-Kurkumen	seskvi					0,14					0,62
13,17	1498		0,2	seskviterpen	seskvi					0,17					
13,18	1499	1485	14,7	Germakren D	seskvi	2,52	0,36		1,53		2,30	1,41	2,08	0,48	2,19
13,242	1506	1489	1,1	β -Selinen	seskvi										0,64
13,27	1508	nema	0,3	seskviterpen	seskvi	0,30									
13,30	1512		0,8	geranil / neril estar	seskvi					0,80					
13,31	1513	1497	0,4	Leden (viridifloren)	seskvi			0,38							
13,33	1515	1500	1,4	Biciklogermacren	seskvi	1,29					0,87			0,90	1,79
13,331	1516			seskviterpen	seskvi							0,80	0,90		

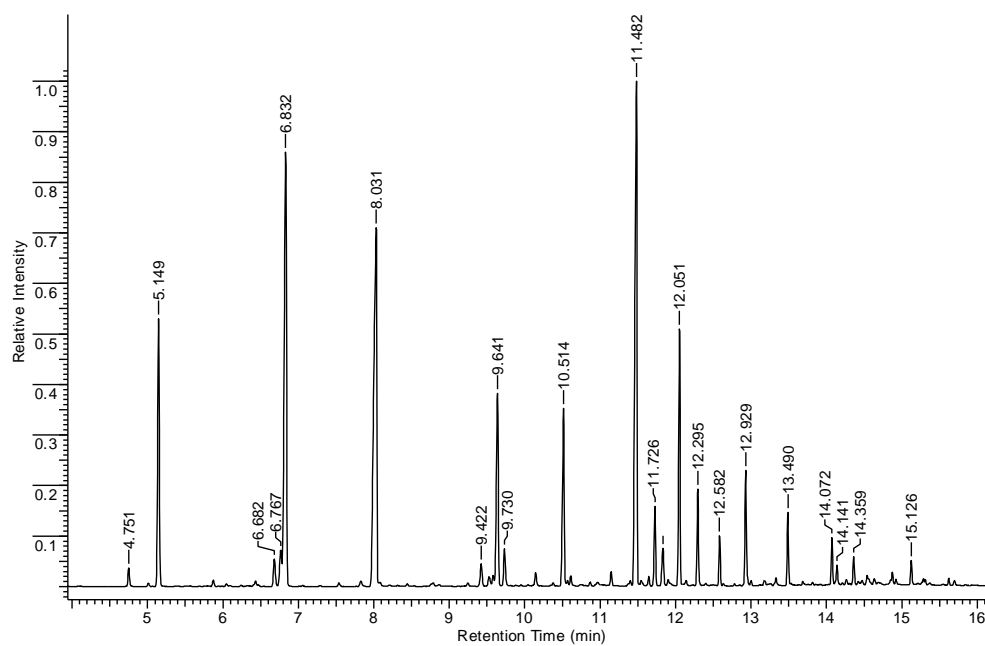
13,36	1519	1506	4,6	β -Bisabolen	seskvi		4,64			0,36				
13,39	1523	1510	0,5	δ -Guaien	seskvi						0,54			
13,48	1532	1514	2,1	γ -Kadinen	seskvi	0,19	0,23	0,08	0,18	0,62	2,11		0,50	0,64
13,51	1536	1523	0,3	β -Seskvifelandren	seskvi						0,33			
13,53	1538	1523	1,5	δ -Kadinen	seskvi			0,19	0,29			1,88	1,09	2,20
				<i>cis</i> -Kalamenen										
13,55	1541	1540	0,3	(Kadina-1,3,5-trien)	seskvi			0,08			0,32			
13,66	1553	nema	3,5	<i>cis</i> - α -Bisabolen like	seskvi		3,45							
13,77	1565	1550	2,0	Elemol	seskvi	1,98								
13,82	1571	1563	0,5	E-nerolidol	seskvi					0,54				
				Kariofilen oksid										
13,86	1575	nema	1,6	izomer	seskvi				0,26	0,14				
13,901	1581	1559	1,4	Germakren B	seskvi									2,27
14,07	1600	1578	6,8	Spatulenol	seskvi	1,61					0,45			
14,14	1608	1583	15,6	Kariofilen oksid	seskvi	0,78			10,57	2,23		1,74		
14,22	1618	1593	1,0	Viridiflorol	seskvi			0,78						
14,26	1624		0,2	seskviterpen	seskvi					0,19				
14,31	1629	1602	0,4	Ledol	seskvi	0,37								
14,36	1636	1608	2,8	Humulen epoksid II	seskvi					0,67				
14,37	1636		0,1	NI				0,13						
14,38	1637	1619	0,6	1,10-di-epi-Kubenol	seskvi									0,60
14,52	1655	1632	0,5	γ -Eudesmol	seskvi	0,45								
14,57	1662		0,5	seskviterpen	seskvi					0,53				
				epi- α -Kadinol (τ -Kadinol)	seskvi						0,46	3,19		
14,69	1676	1654	1,1	α -Kadinol	seskvi				0,29					
14,69	1677	1651	0,9	β -Eudesmol	seskvi	0,91								
14,70	1677		0,2	seskviterpen	seskvi							0,23		
14,71	1679	1654	0,3	α -eudesmol	seskvi	0,26								
14,72	1680		0,9	seskviterpen	seskvi					0,21				
14,77	1686		0,1	seskviterpen	seskvi	0,12								
14,83	1693	1667	1,9	seskviterpen oksid	seskvi					0,64				
				14-hidroks-(Z)-kariofilen										
15,98	1850	1846	0,3	Heksahidrofarnezil aceton						0,25				
17,74	2135		0,5	NI						0,46				

Ukupno Σ	98,1	98,9	99,5	99,0	98,4	100,0	99,6	100,0	100,0	97,3	100,0
Neidentifikovano	2,4	4,6	2,2	4,5	2,8	1,0	-	0,8	1,2	-	0,5
Identifikovano	95,6	94,3	97,3	94,5	95,6	99,0	99,6	99,2	98,8	97,3	99,5

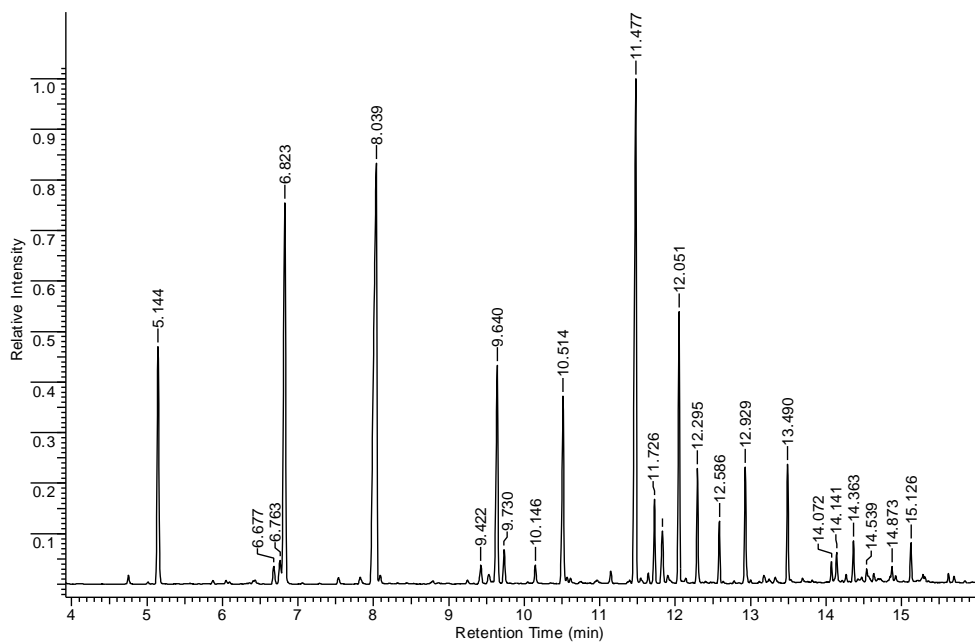
*tR = retenciono vreme [min]; KI eksp = eksperimentalni retencioni indeksi (određeni korišćenjem priložene kalibracije); KI eksp = tablični retencioni indeks za identifikovano jedinjenje; max = najviši sadržaj datog jedinjenja (u svim uzorcima); ID = ime jedinjenja; tip = klasa: monoterpen / seskviterpen / fenol / neterpensko jedinjenje; NI-neidentifikovana komponenta; 1-*J. communis* (planina Romanija, iglice), 2-*J. communis* (planina Romanija, šišarke), 3-*J. communis* (Fruška gora, iglice), 4-*J. communis* (Fruška gora, šišarke)



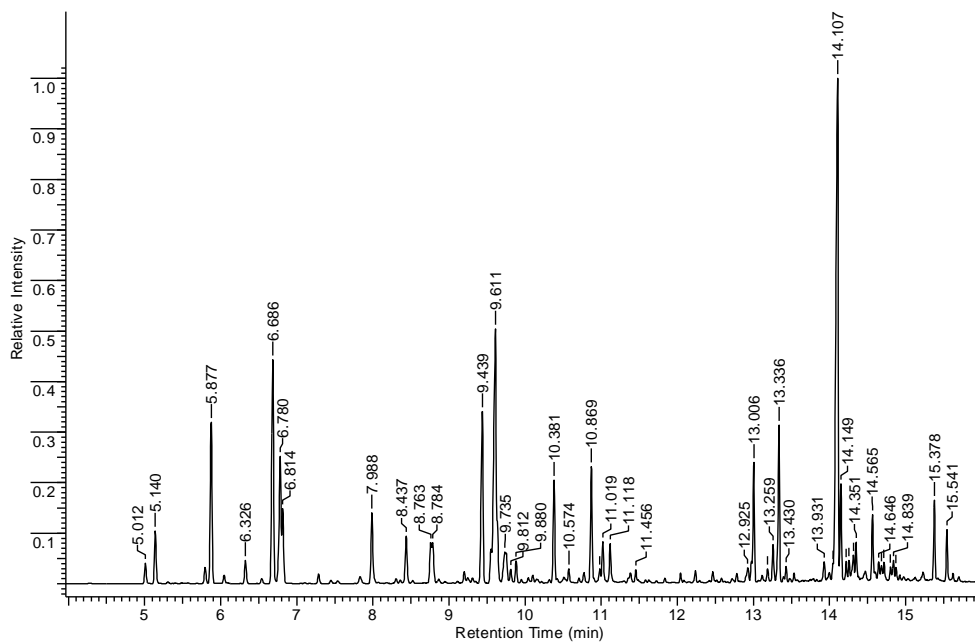
Prilog 9.10. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Myrtus communis* sa lokaliteta Bar



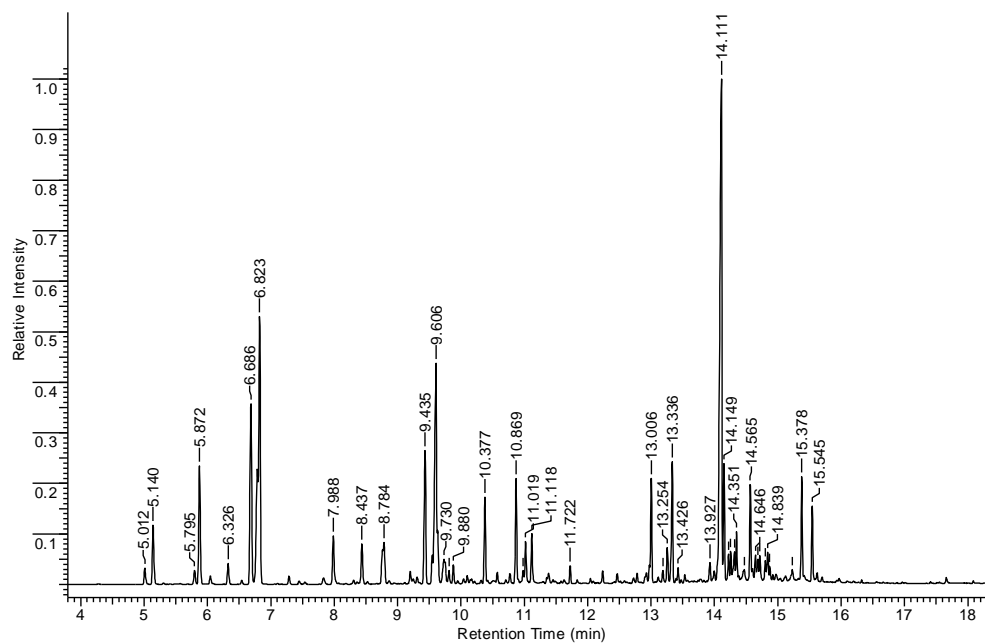
Prilog 9.11. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Myrtus communis* sa lokaliteta Herceg Novi



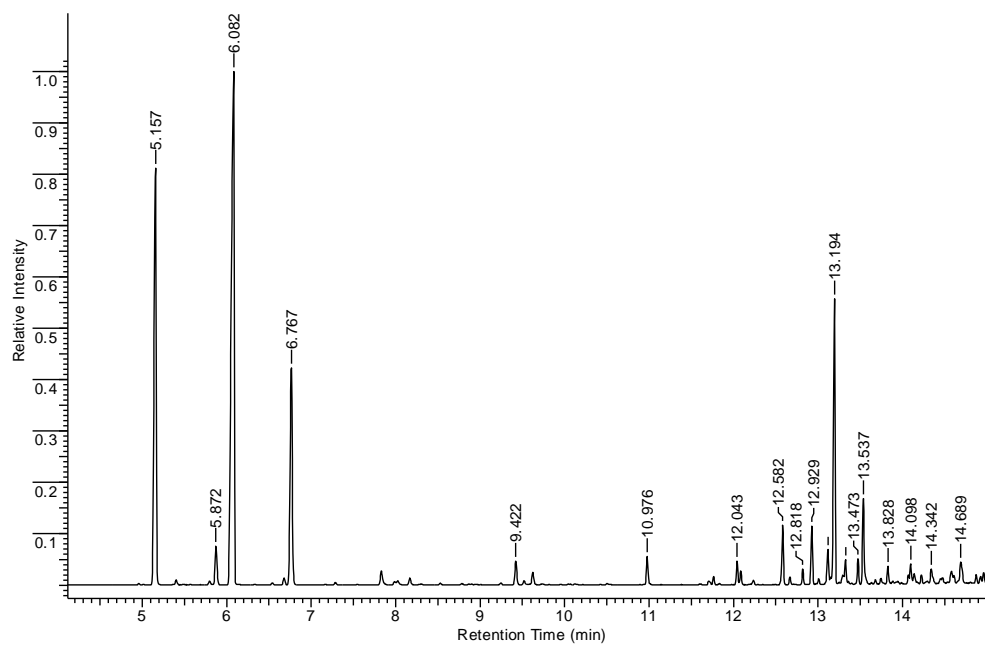
Prilog 9.12. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Myrtus communis* sa lokaliteta Kotor



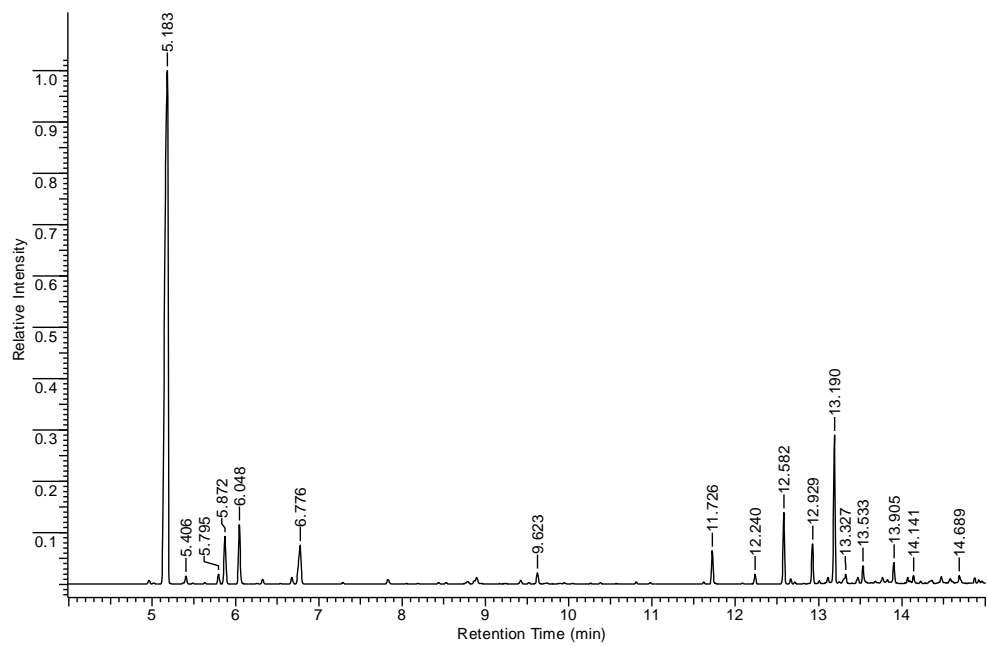
Prilog 9.13. GC-MS hromatogram etarskog ulja vrste *Eucalyptus camaldulensis* Bar



Prilog 9.14. GC-MS hromatogram etarskog ulja vrste *Eucalyptus camaldulensis* Herceg Novi



Prilog 9.15. GC-MS hromatogram uzorka *Juniperus oxycedrus* (iglice), Hvar



Prilog 9.16. GC-MS hromatogram uzorka *Juniperus phoenicea* (šišarke), Hvar

Prilog 9.17. Korelacije između fenotipskih i genotipskih osobina *A. baumannii* i njihove osetljivosti na nekonvencionalne antimikrobne agense

Antimikrobni agens	Fenotipske i genotipske osobine <i>A. baumannii</i> sojeva*						
	Biofilm	Autoagregacija	Hidrofobnost	Pokretljivost	Lektini	<i>bla</i> _{PER-1}	<i>Int-2</i>
<i>E. camaldulensis</i> (EuHN)	0,069;P=0,674	0,282;P=0,087	-0,365;P=0,027	0,111;P=0,501	0,152;P=0,398	0,362;P=0,066	-0,298;P=0,13
<i>E. camaldulensis</i> (EuB)	0,117;P=0,492	0,117;P=0,492	-0,474;P=0,005	-0,145;P=0,395	0,183;P=0,324	0,203;P=0,321	-0,378;P=0,064
<i>Myrtus communis</i> (MyHN)	-0,112;P=0,496	0,186;P=0,257	0,112;P=0,496	0,023;P=0,887	0,342;P=0,056	0,095;P=0,630	0,0;P=1,0
<i>Myrtus communis</i> (MyB)	-0,277;P=0,087	-0,107;P=0,508	-0,25;P=0,123	-0,291;P=0,073	-0,177;P=0,316	0,195;P=0,314	-0,061;P=0,754
<i>Myrtus communis</i> (MyK)	0,028;P=0,87	-0,338;P=0,046	-0,105;P=0,535	-0,122;P=0,472	0,031;P=0,865	-0,177;P=0,383	0,3;P=0,138
<i>J. foetidissima</i> (iglice)	0,009;P=0,955	0,019;P=0,910	0,151;P=0,367	0,090;P=0,592	0,059;P=0,748	-0,282;P=0,161	0,016;P=0,936
<i>J. sabina</i> (iglice)	-0,80;P=0,651	-0,241;P=0,175	0,107;P=0,546	0,161;P=0,366	0,167;P=0,390	0,156;P=0,465	0,045;P=0,831
<i>Hyssopus officinalis</i>	0,058;P=0,743	0,0;P=1,0	0,0;P=1,0	-0,068;P=0,702	0,395;P=0,042	0,225;P=0,290	0,066;P=0,758
<i>Mentha x piperita</i>	0,125;P=0,468	0,161;P=0,351	-0,101;P=0,557	0,024;P=0,890	0,499;P=0,008	0,416;P=0,044	0,121;P=0,557
<i>Satureja hortensis</i>	0,134;P=0,443	-0,290;P=0,098	0,134;P=0,443	-0,142;P=0,419	0,024;P=0,900	-0,370;P=0,078	-0,048;P=0,819
<i>Thymus serpyllum</i>	0,318;P=0,061	-0,106;P=0,532	-0,116;P=0,494	0,030;P=0,858	0,011;P=0,951	-0,396;P=0,051	0,0;P=1,0
<i>Thymus vulgaris</i>	0,148;P=0,365	0,056;P=0,734	-0,148;P=0,365	-0,088;P=0,590	0,131;P=0,462	-0,108;P=0,582	-0,251;P=0,128
<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	0,053;P=0,743	0,114;P=0,477	0,018;P=0,913	-0,079;P=0,622	-0,322;P=0,064	-0,305;P=0,110	0,045;P=0,815
<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	0,221;P=0,172	0,104;P=0,522	0,104;P=0,522	-0,167;P=0,302	-0,198;P=0,259	-0,431;P=0,025	-0,198;P=0,303
<i>Origanum majorana</i>	-0,349;P=0,050	-0,100;P=0,575	-0,187;P=0,294	0,050;P=0,779	0,120;P=0,537	0,398;P=0,062	0,127;P=0,552
<i>Salvia officinalis</i>	0,338;P=0,036	0,169;P=0,295	0,044;P=0,783	-0,178;P=0,270	-0,221;P=0,207	-0,465;P=0,016	-0,060;P=0,754
<i>Melissa officinalis</i>	0,347;P=0,47	-0,093;P=0,596	0,232;P=0,185	0,023;P=0,895	-0,059;P=0,757	-0,403;P=0,054	0,098;P=0,639
<i>Lavandula angustifolia</i>	0,084;P=0,610	0,141;P=0,396	-0,037;P=0,821	-0,061;P=0,713	0,026;P=0,883	-0,245;P=0,216	-0,191;P=0,335
<i>Ocimum basilicum</i>	0,055;P=0,737	-0,64;P=0,695	-0,037;P=0,823	-0,023;P=0,889	0,098;P=0,580	-0,273;P=0,163	-0,249;P=0,203
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,419;P=0,016	-0,055;P=0,754	0,176;P=0,313	0,201;P=0,251	0,014;P=0,943	-0,406;P=0,53	0,124;P=0,555
<i>Foeniculum vulgare</i>	-0,058;P=0,743	-0,291;P=0,102	-0,136;P=0,445	-0,194;P=0,275	0,208;P=0,283	0,225;P=0,290	0,066;P=0,758
<i>Petroselinum crispum</i>	-0,268;P=0,132	-0,188;P=0,291	0,027;P=0,880	-0,107;P=0,546	0,015;P=0,938	0,156;P=0,465	0,045;P=0,831
<i>Coriandrum sativum</i>	0,329;P=0,053	0,017;P=0,922	0,229;P=0,180	0,045;P=0,793	0,038;P=0,838	-0,373;P=0,068	-0,019;P=0,926
<i>Artemisia dracunculus</i>	-0,048;P=0,785	-0,297;P=0,091	-0,144;P=0,414	-0,202;P=0,253	0,217;P=0,259	0,223;P=0,291	0,065;P=0,758
<i>Achillea millefolium</i>	0,517;P=0,002	0,044;P=0,794	0,237;P=0,155	0,005;P=0,977	-0,027;P=0,880	-0,555;P=0,005	0,115;P=0,565
<i>Rumex sanguineus</i>							
4NZ_H_p	-0,026;P=0,126	0,030;P=0,860	-0,020;P=0,906	0,060;P=0,724	-0,170;P=0,360	0,073;P=0,721	0,119;P=0,559
4NZ_R	-0,156;P=0,260	-0,083;P=0,625	-0,114;P=0,502	-0,042;P=0,807	-0,200;P=0,282	-0,045;P=0,824	0,176;P=0,387
4Z_H_p	-0,156;P=0,360	-0,083;P=0,625	-0,114;P=0,502	-0,042;P=0,807	-0,200;P=0,228	-0,045;P=0,824	0,176;P=0,387

	4Z_R	-0,409;P=0,016	0,177;P=0,298	-0,136;P=0,422	0,182;P=0,284	-0,126;P=0,497	0,396;P=0,051	0,0;P=1,0
	<i>Rumex crispus</i>							
	171	-0,104;P=0,546	0,146;P=0,398	0,031;P=0,856	0,141;P=0,415	0,071;P=0,707	0,159;P=0,442	0,106;P=0,608
	179	-0,126;P=0,463	0,136;P=0,426	0,251;P=0,142	0,257;P=0,134	0,041;P=0,824	-0,008;P=0,970	0,302;P=0,141
Bioaktivna komponenta	α -pinen	0,548;P=0,279	0,183;P=0,718	0,548;P=0,279	-0,183;P=0,718	1,0;P=0,0	-	-
	(R)-(+)-limonen	0,548;P=0,279	0,183;P=0,718	-0,183;P=0,718	0,548;P=0,279	0,400;P=0,444	-	-
	sabinen	-0,333;P=0,497	-0,333;P=0,497	0,0;P=1,0	-0,333;P=0,497	-0,548;P=0,279	-	-
	3-karen	-0,333;P=0,497	0,333;P=0,497	0,667;P=1,0	-1,0;P=0,0	0,183;P=0,718	-	-
	α -teprinen	-	-	-	-	-	-	-
	γ -terpinen	-	-	-	-	-	-	-
	terpinolen	-	-	-	-	-	-	-
	(-)-terpinen-4-ol	0,236;P=0,655	0,707;P=0,180	0,707;P=0,180	-0,236;P=0,655	0,755;P=0,157	-	-
	timol	-0,548;P=0,279	0,183;P=0,718	0,548;P=0,279	-0,913;P=0,071	0,0;P=1,0	-	-
	karvakrol	-0,548;P=0,279	-0,183;P=0,718	-0,183;P=0,718	-0,183;P=0,718	-0,800;P=0,126	-	-
	eugenol	0,333;P=0,497	-1,0;P=0,0	-0,667;P=0,174	0,333;P=0,497	-0,183;P=0,718	-	-

* korelacija je smatrana značajnom ako je $P \leq 0,05$; – ne postoji korelacija, jer su svi testirani sojevi posedovali istu osobinu i/ili je agens ispoljio isti efekat na sve testirane sojeve

Prilog 9.18. Korelacija MIC vrednosti etarskih ulja sa koncentracijama etarskih ulja koje su uticale na uklanjanje i formiranje biofilma i planktonskih ćelija u medijumu

Etarsko ulje	Korelacija*			
	MIC-BIC	MIC-PIC	MIC-BEC	MIC-PEC
MyHN	0,423; P=0,213	0,577; P=0,101	-0,282; P=0,424	-
MyB	0,140; P=0,700	0,550; P=0,131	-0,250; P=0,491	-0,564; P=0,121
MyK	0,577; P=0,101	0,551; P=0,104	0,053; P=0,876	-
EuHN	-0,354; P=0,302	-0,354; P=0,302	-0,177; P=0,606	0,566; P=0,090
EuB	0,252; P=0,475	0,333; P=0,318	-0,056; P=0,873	-

* korelacija je smatrana značajnom ako je $P \leq 0,05$, BIC-biofilm inhibitorna koncentracija; PIC-inhibitorna koncentracija planktonskih ćelija; BEC-koncentracija eradikacije biofilma; PEC-koncentracija eradikacije planktonskih ćelija

Biografija

Verica Aleksić je rođena 26. avgusta 1986. u Kruševcu, gde je završila osnovnu školu „Vuk Karadžić“ i prirodno-matematički smer Gimnazije kao odličan đak. Tokom školovanja osvojila je mnogobrojne nagrade na republičkim takmičenjima iz oblasti biologije i sporta, a 2004. godine položila je test MENSA International.



Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu je upisala 2005. godine. U toku studija dobitnik je stipendija Ministarstva prosvete Republike Srbije, stipendije Fonda za podsticanje razvoja naučnog i umetničkog podmlatka Republike Srbije, kao i stipendije Fonda za mlade talente opštine Kruševac. Takođe, dobitnik je nekoliko nagrada Prirodno-matematičkog fakulteta i Univerziteta u Novom Sadu za postignute izuzetne rezultate tokom studija. Na Departmanu za biologiju i ekologiju je diplomirala u septembru 2009. godine i stekla zvanje Diplomirani biolog – molekularni biolog. Iste godine upisala je drugi stepen diplomskih akademskih studija takođe na Departmanu za biologiju i ekologiju, smer Molekularni biolog i izabrana je u zvanje istraživača pripravnika na Katedri za mikrobiologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Master akademske studije završila je 2010. godine i iste godine je upisala Doktorske akademske studije, smer Doktor bioloških nauka.

Od 2011. godine zaposlena je na projektu Prirodno-matematičkog fakulteta pod nazivom „Biloški aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvor novih lekova i dijetetskih suplemenata“ broj OI 172058 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, čiji je rukovodilac prof. dr Neda Mimica-Dukić. Godine 2012. izabrana je u zvanje Istraživača saradnika za užu naučnu oblast Mikrobiologija na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

U toku master i doktorskih studija učestvovala je u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju u okviru predmeta Osnove mikrobiologije, Opšta mikrobiologija i Bakteriologija za studente osnovnih akademskih studija, kao i na predmetima Patogeni mikroorganizmi i Biofilmovi za studente master akademskih studija.

Učestvovala je u realizaciji 6 nacionalnih i 4 međunarodna projekta. Koautor je dva rada u vodećim međunarodnim časopisima kategorije M21 (u kojima su objavljeni rezultati ove disertacije) i četiri rada kategorije M22, a takođe je koautor preko 20 saopštenja na međunarodnim skupovima, kao i preko 15 saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

Od 2011. godine član je Društva mikrobiologa Srbije i Evropskog društva mikrobiologa (*The Federation of European Microbiological Societies - FEMS*), a 2015. godine dobitnik je *FEMS Young Scientists Congress Grant* za učešće na šetom FEMS Kongresu evropskih mikrobiologa (Mastriht, Holandija).



UNIVERZITET U NOVOM SADU • Prirodno-matematički fakultet
21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	Monografska dokumentacija
Tip zapisa, TZ:	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija
Autor, AU:	Verica Aleksić, MSc
Mentor, MN:	Prof. dr Petar Knežević
Naslov rada, NR:	Osetljivost multiplo rezistentnih sojeva <i>Acinetobacter baumannii</i> na nekonvencionalne antimikrobne agense
Jezik publikacije, JP:	Srpski (latinica)
Jezik izvoda, JI:	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja, ZP:	Republika Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	Vojvodina
Godina, GO:	2016
Izdavač, IZ:	Autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada, FO:	Poglavlja (9), strana (351), literaturnih citata (644), tabela (35), slika (57), grafikona (29), priloga (18)
Naučna oblast, NO:	Biologija
Naučna disciplina, ND:	Mikrobiologija
Ključne reči, KR:	<i>Acinetobacter baumannii</i> , multipla rezistencija, nekonvencionalni antimikrobni agensi, sinergizam
Univerzalna decimalna klasifikacija, UDK:	
Čuva se, ČU:	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, PMF Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena, VN:	
Izvod, IZ:	U skladu sa postavljenim ciljevima rada formirana je kolekcija fenotipski i genotipski okarakterisanih multiplo rezistentnih kultura genomske vrste <i>Acinetobacter baumannii</i> . Za sojeve iz kolekcije kultura utvrđen je anti- <i>A. baumannii</i> efekat etarskih ulja, biljnih ekstrakata i njihovih bioaktivnih komponenti, kao nekonvencionalnih antimikrobnih agensa. Takođe, osim njihovog pojedinačnog efekta utvrđen je i kombinovani efekat konvencionalnih i nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa, koji je dovedo do redukcije minimalnih inhibicionih koncentracija oba agensa u kombinaciji. Kombinacije etarskih ulja i njihovih bioaktivnih komponenti sa trenutno dostupnim konvencionalnim antibioticima, čija je efikasnost smanjena kada se primenjuju pojedinačno, predstavljaju novu perspektivnu strategiju u terapiji infekcija multiplo rezistentnim sojevima vrste <i>A. baumannii</i> .
Datum prihvatanja teme od strane NN veća, DP:	27.05.2014.
Datum odbrane, DO:	
Članovi komisije, KO:	
Predsednik:	Dr Neda Mimica Dukić, redovni profesor, PMF, Novi Sad
Mentor:	Dr Petar Knežević, vanredni profesor, PMF, Novi Sad
Član:	Dr Ružica Igić, redovni profesor, PMF, Novi Sad
Član:	Dr Jelena Knežević Vukčević, redovni profesor, BF, Beograd



UNIVERSITY OF NOVI SAD • Faculty of Science
21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monograph type
Type of record, TR:	Printed text
Contents code, CC:	PhD thesis
Author, AU:	Verica Aleksić, MSc
Mentor, MN:	Dr Petar Knežević, asisstant professor
Title, TL:	Sensitivity of multi-drug resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> strains to unconventional antimicrobial agents
Language of text, LT:	Serbian (Latin alphabet)
Language of abstract, LA:	Serbian/English
Contry of publication, CP:	Republic of Serbia
Locality of publication, LP:	Vojvodina
Publication year, PY:	2016
Publisher, PU:	Author's reprint
Publ. place, PP:	Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja Obradovića 2
Physical description, PD:	Chapters (9), pages (351), references (644), figures (57), tables (35), graphs (29), additional lists (18)
Scientific field, SF:	Biology
Scientific discipline, SD:	Microbiology
Key words, KW:	<i>Acinetobacter baumannii</i> , multidrug-resistance, unconventional antimicrobial agents, essential oils, synergism
Universal decimal classification, UDC:	
Holding data, HD:	The Library of Dept. of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Serbia
Note, N:	
Abstract: AB	In accordance to the aims of the work the collection of phenotypic and genotypic characterized multidrug-resistant cultures of genomic species <i>Acinetobacter baumannii</i> was formed. For the strains from the culture collection an anti- <i>A. baumannii</i> effect of the essential oils, plant extracts and their bioactive components, as non-conventional antimicrobial agents, was determined. Also, in addition to their individual effect the combined effect of conventional and non-conventional antimicrobial agents was determined, which lead to a reduction of the minimal inhibitroy cocntrations of both agents in combination. Combinations of the essential oils and their bioactive components with the currently available conventional antibiotics, whose efficiency reduced when administered individually, represent a promising new strategy for the treatment of infections caused by multidrug-resistant <i>A. baumannii</i> .
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	27.05.2014.
Defended on, DE:	
Thesis defend board, DB:	
Chairperson:	Dr Neda Mimica Dukić, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Mentor:	Dr Petar Knežević, asisstant professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Member:	Dr Ružica Igić, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Member:	Dr Jelena Knežević Vukčević, full professor, Faculty of Biology, Belgrade