

# Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na proizvodnju pigmenta piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

---

Tolić, Zrinka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:514349>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Zrinka Tolić**

**Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na proizvodnju pigmenta piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na razumijevanju, prenesenom znanju, uloženom trudu i vremenu prilikom izrade ovog diplomskog rada. Također bih se htjela zahvaliti svojoj prijateljici i kolegici Fani Španić na potpori u svemu kroz što smo prošle tijekom ovog studija. Zahvaljujem svojoj obitelji, dečku i prijateljima na strpljenju i pruženoj podršci.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Faktori virulencije .....	1
1.1.2 Bakterijska međustanična komunikacija i stvaranje biofilma .....	2
1.1.3 Piocijanin .....	5
1.1.4 Klinički značaj .....	7
<b>1.2. ETERIČNO ULJE BILJKE MICROMERIA THYMIFOLIA.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 <i>Micromeria thymifolia</i> (Scop.) Fritsch .....	8
1.2.2 Antibakterijski učinak eteričnih ulja .....	8
1.2.3 Pulegon .....	9
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. MATERIJALI.....</b>	<b>12</b>
3.1.1. Bakterije.....	12
3.1.2. Standardne kemikalije i otopine.....	12
3.1.3. Eterično ulje i komponente .....	12
3.1.4. Antibiotici .....	12
3.1.5. Hranjivi mediji .....	12
<b>3.2. METODE.....</b>	<b>13</b>
3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja vrste <i>Micromeria thymifolia</i> i pulegona .....	13
3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina .....	13
3.2.3. Priprema i tretiranje bakterijske kulture s otopinama eteričnog ulja mikromerije, pulegona i tobramicina.....	13
3.2.4. Određivanje vrijednosti optičke gustoće bakterijske kulture .....	15
3.2.5. Ekstrakcija piocijanina.....	15
3.2.6. Statistička analiza.....	17
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA TOBRAMICINA .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. UČINAK ETERIČNOG ULJA MIKROMERIJE, PULEGONA I TOBRAMICINA NA RAST PLANKTONSKIH STANICA BAKTERIJE <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3. UČINAK ETERIČNOG ULJA MIKROMERIJE, PULEGONA I TOBRAMICINA NA PROIZVODNJU PIOCIJANINA .....</b>	<b>21</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>25</b>

<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>29</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>30</b>
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>34</b>

## 1.UVOD

### 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* smatra se klinički najznačajnijom vrstom unutar roda *Pseudomonas*. Bakterije roda *Pseudomonas* pripadaju skupini asporogenih aerobnih gram-negativnih štapića. Zajedno s acinetobacterom i drugim srodnim nefermentativnim bakterijama spadaju u skupinu oportunističkih patogena ljudi, biljaka i životinja. Zahvaljujući fiziološkoj i metaboličkoj raznolikosti široko su rasprostranjene u različitim okolišnim uvjetima te imaju sposobnost kolonizacije različitih tipova staništa. *P. aeruginosa* pomoću svojih mehanizama adaptacije i preživljavanja u nepogodnim uvjetima najčešće uzrokuje oportunističke infekcije kod imunokompromitiranih bolesnika. Infekcija započinje bakterijskom kolonizacijom na koži ili sluznicama pri čemu je značajna sposobnost stvaranja biofilma. Nakon toga može doći do nastanka diseminirane bolesti, bakterijemije i sepse prodorom u tkiva i organe. Glavnu ulogu u etiologiji sepse uzrokovane infekcijom *P. aeruginosa* ima lipopolisaharid koji spada u njene strukturne faktore virulencije (Kalenić i sur., 2013.; Silby i sur., 2011.).

#### 1.1.1. Faktori virulencije

Jedna od strategija preživljavanja patogena je proizvodnja faktora virulencije kako bi mogli izbjeći odgovor imunskog sustava domaćina. Na taj način omogućena im je progresija i kolonizacija (Mordali i sur., 2017.). *Pseudomonas aeruginosa* ima sposobnost proizvodnje velikog broja faktora virulencije koji se dijele na strukturne i sekrecijske. Strukturni faktori virulencije imaju ulogu u zaštiti od fagocitoze, protutijela i komplementa. U njih spadaju flagela (polarni bič), fimbrije (pili) i lipopolisaharid koji se nalaze vezani za staničnu površinu. Fimbrije zajedno s mucin-vežućim proteinom vanjske membrane F, površinskim lektinima i mukoidnim egzopolisaharidima (alginat, kapsula) imaju važnu ulogu u adheziji mikroorganizma za druge površine. Sekrecijski faktori virulencije dijele se u tri tipa sekrecijskog sustava. Uloga sekrecijskih faktora je oštećenje fizikalnih barijera i obrane organizma te na taj način stvaranje pogodnije okoline za razvoj i razmnožavanje bakterije. Prvi tip sekrecijskog sustava čine proteini pirocijanin i pioverdin te enzim alkalna proteaza. U drugi tip sekrecijskog sustava spadaju enzimi proteaze, elastaze i fosfolipaze kao i egzotoksin A. Fosfolipaza C ima ulogu razgradnje fosfolipida. Razgrađujući fosfatidilkolin, koji je važan sastojak sufraktanta, omogućuje invaziju plućnog tkiva. Egzotoksin A zajedno s

lipopolisaharidom, koji se smatra endotoksinom, čine glavne faktore virulencije koji kod teških infekcija izazivaju sistemsku toksičnost. Treći tip sekrecijskog sustava smatra se jednom od glavnih determinanti virulencije bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Taj sekrecijski sustav čine signalne molekule važne za ostvarivanje bakterijske međustanične komunikacije (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) i mukoidni egzopolisaharidi (alginat). Ovaj tip sekrecijskog sustava zahtijeva kontakt posredovan pilima između bakterije i epitelne stanice te na taj način uzrokuje akutnu invazivnu infekciju (Kalenić i sur., 2013). Proizvodnja velikog broja virulentnih faktora je metabolički zahtjevan proces te je važna zajednička suradnja kolonije bakterija. Ta međusobna suradnja kontrolirana je bakterijskom međustaničnom komunikacijom (engl. *quorum sensing*, QS) (Moradali i sur., 2017).

### **1.1.2 Bakterijska međustanična komunikacija i stvaranje biofilma**

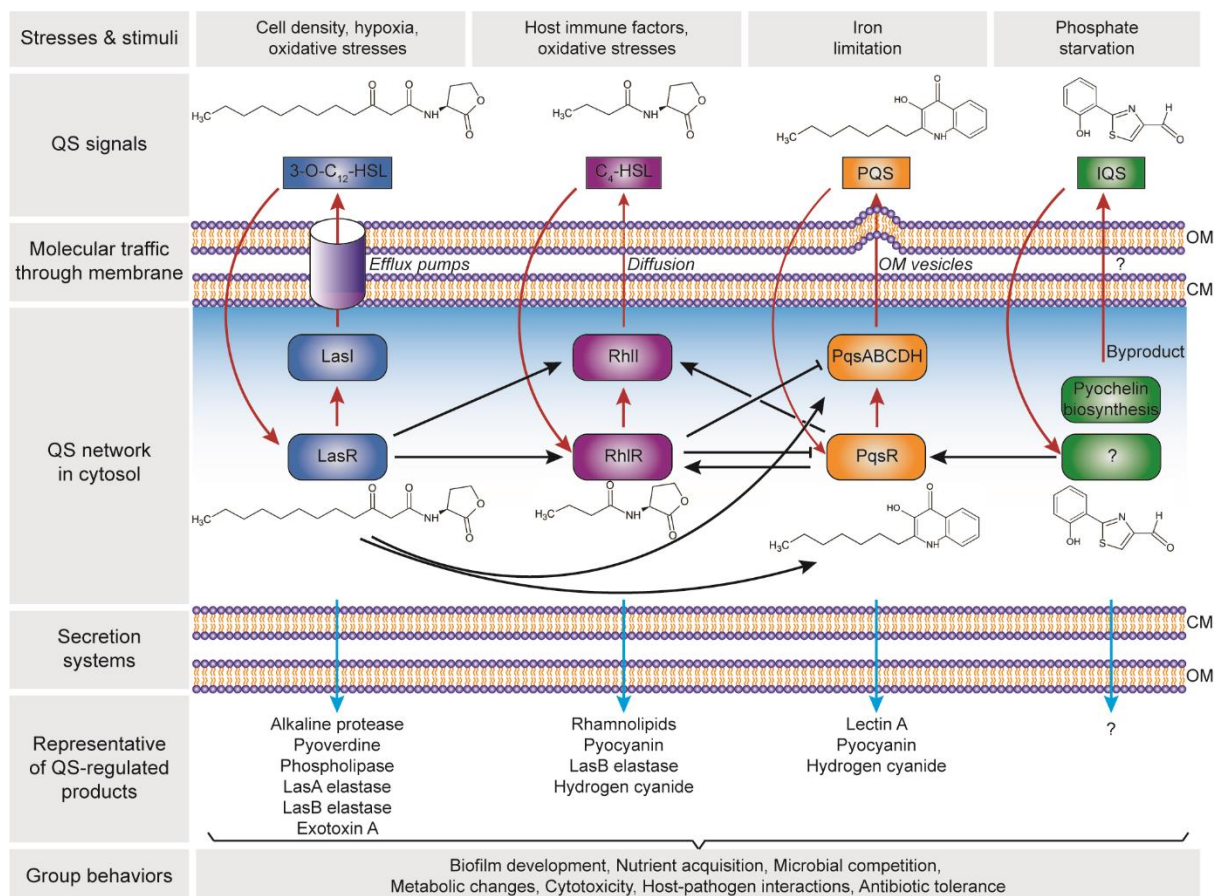
Stvaranje biofilma jedan je od dodatnih čimbenika virulencije bakterije. Biofilm je kompleksni agregat bakterija u samogeneriranom matriksu izvanstaničnih polimernih tvari. Jedna je od ključnih strategija za preživljavanje vrsta tijekom neočekivanih promjena životnih uvjeta kao što su fluktuacije temperature i dostupnosti hranjivih tvari. Biofilm treba promatrati kao mobilnu funkcionalnu zajednicu s obilježjima cjelovitog mikroorganizma kao što su: homeostaza, krvožilni sustav, izmjena genetičkog materijala i metabolička aktivnost (Thi i sur., 2020; Živković i sur., 2018). Biofilm se sastoji od izvanstaničnih polimernih tvari koje su uglavnom polisaharidi, proteini, ekstracelularna DNA (eDNA) i lipidi. Egzopolisaharidi Psl, Pel i alginat su jedne od glavnih sastavnica matriksa. Zajedno s eDNA određuju arhitekturu biofilma. Polisaharid Psl jako je važan u ranim stadijima razvoja biofilma. Važan je u zaštiti od oksidativnog stresa i fagocitoze. Polisaharid Pel jako je važan kod iniciranja i održavanja stanične komunikacije. Pokazao se važnim i u zaštiti od aminoglikozidnih antibiotika. Povećana proizvodnja alginata karakteristika je mukoidnog fenotipa *Pseudomonas aeruginose*, koji je često izoliran kod pacijenta s cističnom fibrozom. Alginat je jako važan za strukturu biofilma i u zaštiti bakterijskih stanica od fagocitoze i slobodnih radikala koji se oslobađaju prilikom imunskog odgovora. Ekstracelularna DNA ima višestruku ulogu u formiranju biofilma. Doprinosi stvaranju kationskog gradijenta u biofilmu keliranjem kationa kao što su  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ . Izvor je hranjivih tvari tijekom gladovanja, olakšava pokretljivost stanica i koordinaciju pokreta te pridonosi rezistenciji na antibiotike. Smatra se najzastupljenijim polimerom čineći često više od 50% polimernog matriksa. Zbog brojnih

uloga i velike zastupljenosti važna je meta u kliničkim istraživanjima kontrole razvoja biofilma.(Meirelles i Newman, 2018; Moradali i sur., 2017). Ekstracelularna DNA se može oslobađati putevima ovisnim i neovisnim o bakterijskoj međustaničnoj komunikaciji. Oslobađanje regulirano mehanizmima bakterijske međustanične komunikacije odvija se izom male populacija stanica. Jedan od načina poticanja lize stanica je unutarstanično povećanje vodikovog peroksida izlaganjem piocijaninu. Dolazi do stvaranja membranskih vezikula ispunjenih eDNA i drugim citosolnim sadržajem. Jednom oslobođena eDNA stupa u interakciju s izvanstaničnim  $Ca^{2+}$  te izaziva agregaciju bakterija potičući stvaranje biofilma i naknadno sazrijevanje. Biofilmovi *P. aeruginosa* povećavaju toleranciju na antibiotike i otpornost na reakcije imunskog sustava domaćina, što otežava njihovo čišćenje i dovodi do kroničnih infekcija (Cendra i Torrents, 2021).

Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*, QS) ima važnu ulogu u stvaranju biofilma. Uključena je u regulaciju gena važnih za razvoj biofilma(Cendra i Torrents, 2021). Pomoću isprepletenih signalnih puteva moguća je individualna komunikacija između bakterija kao i zajednička organizacija bakterijske zajednice. Do aktivacije bakterijske međustanične komunikacije dolazi prilikom promjena u gustoći stanica, kao odgovor na neke promijene u okolini ili prilikom stresa. To uključuje proizvodnju, izlučivanje i akumulaciju signalnih molekula zvanih autoinduktora (AI). Transkripcijski faktori prepoznaju specifičnost i koncentraciju autoinduktora na temelju čega potiču transkripciju određenih gena. Osim velike važnosti u formiranju biofilma, QS pridonosi fiziološkim procesima kao što su prilagodba metabolizma, proizvodnja faktora virulencije, tolerancija na stresne uvjete, interakcija s domaćinom. Postoje četiri glavna puta QS-a kod *P. aeruginosa* kao što je prikazano na slici 1. To su putevi Las, RhI, PQS i IQS. Organizirani su hijerarhijski sa sustavom Las na vrhu. Sustavi Las i RhI se aktiviraju u ranim stadijima pod utjecajem promjena u gustoći stanica, dok se sustavi PQS i IQS aktiviraju u kasnijim fazama. Aktivacija puta PQS potaknuta je manjkom željeza dok je aktivacija sustava IQS potaknuta manjkom fosfata. Aktivacijom ovih puteva dolazi do unutarstanične proizvodnje autoinduktora (AI) kao što su HSL (N-3-okso-dodekanoil-L-homoserin lakton), BHL (N-butilil-L-homoserin lakton), PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon), i IQS (2-(2-hidroksifenil)-4-tiazol-karbaldehid). Te signalne molekule vežu se na svoje regulatorne proteine (LasR, RhIR, PqsR) s kojima stvaraju kompleks i dovode do transkripcije gena (*lasI*, *rhII*, *pqsABCDH*). Aktivacijom tih gena dolazi do nastanka elemenata važnih za razvoj funkcionalnog biofilma kao što su: ramnolipidi, pioverdin, piocijanin, polisaharid Pel, elastaze, lektin A. Ramnolipid je glikolipidni spoj koji sadrži ramnozu, djeluje



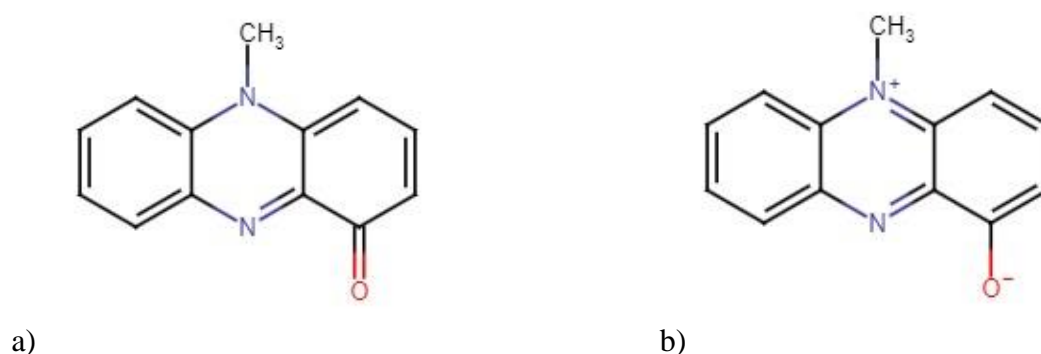
na očuvanje pora i kanala između mikrokolonija, omogućujući prolaz tekućine i hranjivih tvari unutar biofilma. Pioverdin može sekvestrirati željezo u okolišu i dostaviti ga u stanicu, što je bitna komponenta za razvoj biofilma u okruženju u kojem je količina željeza ograničena. Piocijanin je sekundarni metabolit s citotoksičnim učinkom, čime izaziva lizu stanice i oslobađa DNA stanice u izvanstanični prostor. Polisaharidi Pel imaju ulogu u jačanju strukture biofilma kationsko-anionskim interakcijama s eDNA u strukturi biofilma. Lektini su topljivi proteini smješteni u vanjskoj membrani, a sastoje se od dva oblika, tj. LecA (koji se veže za galaktozu i njene derivate) i LecB (koji se veže na fukozu, manozu i oligosaharide koji sadrže manozu). Lektini imaju adhezivna svojstva koja im olakšavaju prianjanje na biološke površine kao što su epitel i sluznica. Molekularne i stanične interakcije u kombinaciji s drugim polimernim tvarima dovode do stvaranja biofilma. Put IQS zadnji je otkriven i o njemu se za sada najmanje zna. Smatra se da je molekula IQS nusprodukt biosinteze siderofora piokelina (Thi i sur., 2020).



**Slika 1.** Shematski prikaz četiriju puta bakterijske međustanične komunikacije i njihova međusobna isprepletenost (preuzeto iz Thi i sur., 2020).

### 1.1.3 Piocijanin

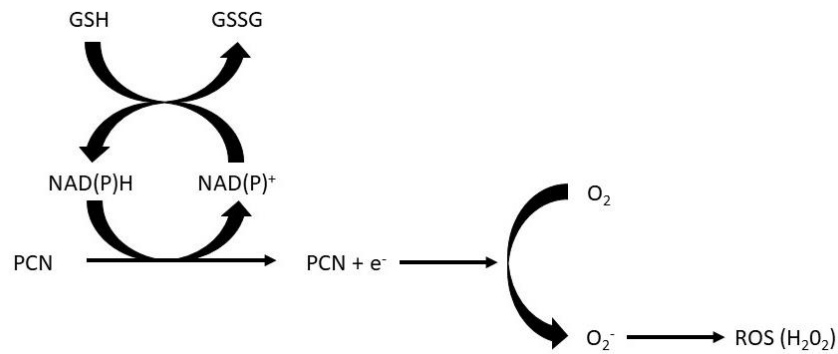
Piocijanin, pigment plave boje, jedan je od sekrecijskih faktora virulencije bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Prema kemijskoj strukturi spada u skupinu fenazina. Kemijska struktura piocijanina prikazana je na slici 2. Fenazini su aromatski triciklički spojevi koji u svojoj strukturi sadrže dva atoma dušika. Piocijanin je dipolarni ion („zwitterion“). U strukturi sadrži fenolnu skupinu koja mu daje karakter slabe kiseline (pKa 4,9) (Hall i sur., 2016).



**Slika 2.** Prikaz kemijske strukture piocijanina pri različitim pH vrijednostima (izrađeno u programu Chemspace):

- a) prikaz kemijske strukture piocijanina u nenabijenom obliku;
- b) prikaz kemijske strukture piocijanina pri fiziološkom pH.

Dva atoma dušika u središnjem prstenu omogućuju mu posredovanje u prijenosu elektrona. Neke od važnijih fizioloških uloga su mu: sudjelovanje u staničnoj signalizaciji, prijenos elektrona na različite oksidanse i preživljavanje u okruženju u kojem je smanjeno prisustvo elektron akceptora. Smatra se faktorom virulencije zbog svoje sposobnosti brze redukcije molekularnog kisika. U citosolu stanice ulazi u reakciju s NADH ili NADPH pri čemu se reducira kao što je prikazano na slici 3. U reduciranom obliku ima sposobnost prijenosa elektrona na molekularni kisik. Na taj način iz molekularnog kisika nastaju radikal superoksidni anion i vodikov peroksid koji su izuzetno toksični.



**Slika 3.** Shematski prikaz nastanka citotoksičnih radikala djelovanjem piocijanina.

Štetnom učinku doprinosi induciranje sekrecije proupalnog IL-8, smanjenje razine glutationa u stanici i inhibicija aktivnosti katalaze. Piocijanin je također jako važan u stvaranju biofilma. U ranim stadijima razvoja biofilma generiranjem oksidativnog stresa može dovesti do samootrovanja pri čemu će doći do lize stanice i ispuštanja glavne sastavnice biofilma, eDNA, u matriks. Piocijanin se može vezati na eDNA i na taj način povećati viskoznost medija čime će se pojačati agregacija stanica i interakcija biofilma s okolinom. Drugi način na koji može sudjelovati u formiranju biofilma je indirektnim putem kontroliranjem razine sekundarnog glasnika cikličkog dimera gvanozina i proizvodnje izvanstaničnih polimernih tvari. Važan je u hipoksičnim uvjetima u kojima preuzima ulogu alternativnog akceptora elektrona te na taj način ublažava stres i omogućuje daljnji razvoj biofilma. Na razini same bakterijske stanice piocijanin može imati pozitivan i štetan učinak ovisno o okolišnim čimbenicima i fiziološkom stanju stanice. Kada su stanice u stanju oksidativnog stresa (tj. pune oksidansa, ali su reducensi ograničeni) i smanjena je razina ATP-a, piocijanin je toksičan i uzrokuje lizu stanice. Kada ima dovoljno reducensa, ali su oksidansi ograničeni, piocijanin potiče održivost i ekspanziju biofilma (Saunders i sur., 2020; Thi i sur., 2020; Meirelles i Newman, 2018; Rada i sur., 2008).

#### 1.1.4 Klinički značaj

*Pseudomonas aeruginosa*, kao klinički najznačajnija vrsta oportunističkog patogena unutar roda *Pseudomonas*, uzrokuje infekcije dišnih i mokraćnih puteva, kao i infekcije krvi. Najčešći je kolonizator medicinskih uređaja (ovlaživača, katetera i raspršivača). Zbog svega navedenog često je uzročnik bolničkih infekcija. U tim slučajevima najčešće dolazi do respiratorne upale pluća, meningoencefalitisa i sepse. Jedan je od najčešćih patogenih organizama izoliranih iz respiratornog trakta bolesnika s cističnom fibrozom. To je genetički poremećaj uzrokovan mutacijama u obje kopije gena koje kodiraju transmembranski regulator provodljivosti cistične fibroze (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR), što dovodi do stvaranja debelog sloja sluzi na površinama dišnih putova pacijenata. Debeli sloj sluzi otežava mukocilijarni klirens, smanjuje internalizaciju bakterija putem epitelnih stanica pluća i inhibira antimikrobne peptide. Pokazalo se da prisustvo bakterije *P. aeruginosa* kod takvih bolesnika dovodi do veće stope plućne egzacerbacije i hospitalizacije uz bržu progresiju bolesti. To dovodi do nepovratnih i destruktivnih promjena u dišnom sustavu te je također povezano s češćim komplikacijama cistične fibroze, kao što su pothranjenost ili dijabetes. Genom bakterije *P. aeruginosa* u usporedbi s drugim sekvenciranim bakterijama, kao što su *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, i *Mycobacterium tuberculosis*, sadrži veći spektar čimbenika virulencije i determinanti rezistencije na antibiotike. Složenost genoma *P. aeruginosa* omogućuje veliku metaboličku svestranost i visoku prilagodljivost promjenama okoliša. Liječenje infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa* može biti teško zbog prirodne i stečene rezistencije na antibiotike. Prirodna rezistencija odnosi se na nepropusnost vanjske membrane, ekspresiju efluksnih pumpi koje izbacuju antibiotike iz stanice i proizvodnju enzima koji inaktiviraju antibiotike. U stečenu rezistenciju na antibiotike spada sposobnost razvoja biofilma, koji otežava prodor antibiotika do bakterijskih stanica, kao i mutacijske promjene ili stjecanje gena otpornosti horizontalnim prijenosom gena. Pojava multirezistentnih sojeva *P. aeruginosa* postaje sve većim javnozdravstvenim problemom (Mielko i sur., 2019; Pang i sur., 2019).

## **1.2. Eterično ulje biljke *Micromeria thymifolia***

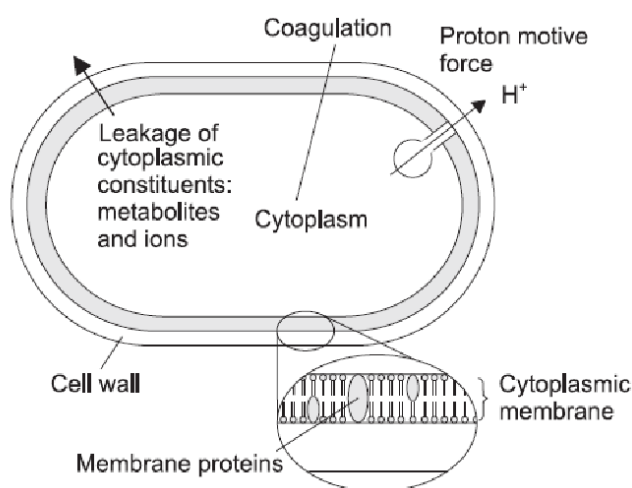
### **1.2.1 *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch**

*Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch pripada porodici biljaka usnača (Lamiaceae ili Labiatae). Višegodišnji polugrm visine 20-40 cm široko je rasprostranjen na području jugoistočne Europe, uključujući Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu, Srbiju, Crnu Goru, Makedoniju i sjeveroistočnu Italiju. Na području Hrvatske poznata je i pod nazivom gorska bresina odnosno timijanolisni vrsić. U narodnoj medicini često se koristila za liječenje problema vezanih uz živčani, probavni i dišni sustav. Eterično ulje i etanolni ekstrakt ove biljke pokazali su širok spektar antimikrobnog djelovanja. Velika je varijabilnost sastava eteričnog ulja u ovisnosti o mjestu rasta i načinu uzgoja biljke. Razvijaju se različiti kemotipovi s različitim omjerom sastavnica. Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja mikromerije su: piperitenon-oksid, pulegon i izopulegon (Bukvički i sur., 2016; Vladimir-Knežević i sur., 2000).

### **1.2.2 Antibakterijski učinak eteričnih ulja**

Razvoj bakterijske rezistencije na antibiotike sve je veći globalni problem. Sve veći predmet zanimanja znanstvenika postaje antimikroban učinak sastavnica eteričnih ulja. Eterična ulja su vrlo složene prirodne mješavine koje sadrže veliki broj komponenti u različitim koncentracijama. Svako eterično ulje definirano je s dvije do tri komponente koje su u njemu prisutne u većoj koncentraciji (20-70%). Te sastavnice definiraju farmakološke i biološke karakteristike samog ulja. Komponente eteričnog ulja dijele se u dvije glavne skupine. Terpeni ili terpenoidi su spojevi koji spadaju u prvu skupinu, dok druga skupina uključuje aromatske i alifatske sastojke. Brojna istraživanja su dokazala antimikrobno djelovanje eteričnih ulja. Eterična ulja porodice Lamiaceae pokazala su najveću antimikrobnu učinkovitost. S obzirom na brojne komponente sadržane u određenim eteričnim uljima, antibakterijska aktivnost ulja može se objasniti specifičnim reakcijama. Neki od mehanizama antibakterijske aktivnosti prikazani su na slici 4. Jedan od mehanizama temelji se na lipofilnim svojstvima i funkcionalnim skupinama samih eteričnih ulja. Snažno antimikrobno djelovanje eteričnih ulja temelji se na visokoj razini fenolnih komponenti poput karvakrola, eugenola i timola. Fenolni spojevi reagiraju s citoplazmatskom membranom pri čemu uzrokuju njenu leziju, mijenjaju njezinu propusnost i uzrokuju gubitak citoplazmatskog sadržaja. Promjene u propusnosti membrane uzrokovat će promjenu membranskog potencijala, kao i pH unutarstaničnog

matriksa. Mogu ometati komunikaciju QS inhibicijom stvaranja signala, blokiranjem receptora te samom razgradnjom signalnih molekula. Neke terpenoidne molekule s funkcionalnim skupinama poput fenola, alkohola i aldehida utječu na proteine membrane smanjenjem ili potpunom inhibicijom njihove aktivnosti. Smatra se da velika složenost struktura eteričnih ulja i činjenica da eterična ulja djeluju istovremeno na nekoliko ciljnih mjesta u bakterijskim stanicama dovodi do manje rezistentnosti bakterija na eterična ulja (Pecarski i sur., 2014; Dorman i Deans, 2000).

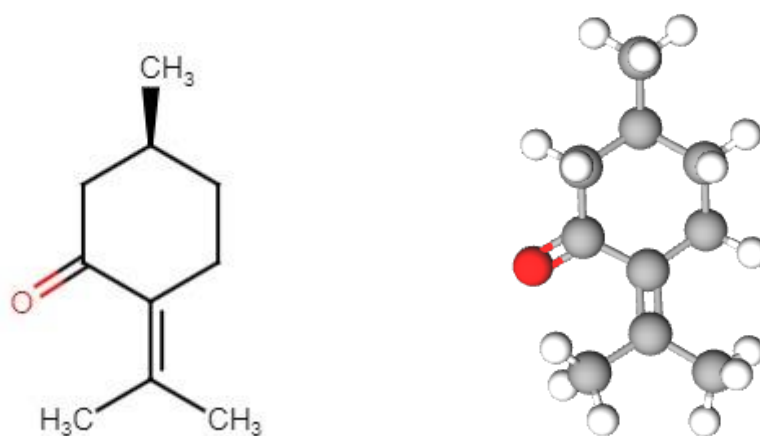


**Slika 4.** Mehanizmi antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja (preuzeto iz Nur Ashakirin i sur., 2017).

### 1.2.3 Pulegon

Pulegon (5-metil-2-(1-metil-etilidin)-cikloheksanon) je prirodni organski spoj, prema kemijskoj strukturi monoterpenski keton. Struktura pulegona prikazana je na slici 5. Prirodno se nalazi u biljkama porodice usnača (Lamiaceae ili Labiatae). Eterična ulja pojedinih biljnih vrsta, kao što su *Mentha piperita L.*, *Mentha pulegium L.*, *Ziziphora clinopodioides*, *Nepeta cataria*, *Micromeria thymifolia*, služe kao izvor pulegona. Količina pulegona u raznim uljima varira ovisno o nekoliko čimbenika kao što je podrijetlo biljke, vremenski uvjeti, datum berbe, starost biljke, gnojidba, mjesto i vrijeme sadnje. Pulegon u svojoj strukturi sadrži kiralni centar pa je u prirodi prisutan u obliku dva enantiomera uz veću zastupljenost (R)-(+)-enantiomera u eteričnim uljima. Bezbojan je i pruža ugodan miris sličan pepermintu i kamforu. Listovi i cvjetni vrhovi biljnih vrsta koje sadrže pulegon koriste se kao tradicionalni lijek, aroma, začini za kuhanje čajeva. Smatra se da pulegon pokazuje višestruke biološke aktivnosti uključujući antioksidativno, antimikrobno i insekticid (Meirelles i Newman, 2018; Moradali i sur., 2017).

Ekstracelularna DNA sa koje sadrže pulegon koriste se kao tradicionalni lijek, aroma, začin te za kuhanje čajeva. Smatra se da pulegon pokazuje višestruke biološke aktivnosti uključujući antioksidativno, antimikrobno i insekticidno djelovanje (Roy i sur., 2018.; Silveira i sur., 2014.). Istraživanja su pokazala da promijene u strukturi pulegona dovode do smanjenja njegove antimikrobne sposobnosti. Redukcijom dvostruke veze između C4 i C7 atoma nastaje menton. Menton je pokazao manju antimikrobnu aktivnost. Istraživanjem antimikrobne aktivnosti limonena i piperiton oksida u odnosu na pulegon također se zamijetila snižena antimikrobna aktivnost (Božovic i sur., 2015).



*Slika 5.* Kemijska struktura (R)-(+)-pulegona ( $C_{10}H_{16}O$ ) (izrađeno u programu Chemspace).

## 2.OBRAZLOŽENJE TEME

Liječenje infekcija *P. aeruginosa* postalo je veliki izazov zbog sposobnosti ove bakterije da odoli mnogim trenutno dostupnim antibioticima. Prekomjerna upotreba antibiotika tijekom liječenja ubrzava razvoj višestruko rezistente *P. aeruginosa*, što dovodi do neučinkovitosti empirijske antibiotske terapije protiv ovog mikroorganizma (Pang i sur., 2019). Iz navedenih razloga od sve većeg interesa su istraživanja alternativnih terapijskih pristupa u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*.

Cilj ovog rada je ispitati djelovanje eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i njenog monoterpenskog sastojka pulegona na bakterijsku vrstu *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Specifični ciljevi ovog rada su sljedeći:

1. Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona u na proizvodnju piocijanina i rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* PAO1.
2. Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona u kombinaciji s tobramicinom na proizvodnju piocijanina i rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* PAO1.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Bakterije**

U ovom istraživanju ispitivana je bakterijska vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, soj PAO1 (Leibnitz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; kataloški broj DSM 1707).

##### **3.1.2. Standardne kemikalije i otopine**

- kloroform (Riedel-de-Haën)
- klorovodična kiselina, HCl (Lach-Ner)
- dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma)

##### **3.1.3. Eterično ulje i komponente**

- eterično ulje biljne vrste *Micromeria officinalis* (Scop.) Fritsch, Lamiaceae (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir Knežević, Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu)
- pulegon (Sigma Aldrich)

##### **3.1.4. Antibiotici**

- Tobramicin sulfat (Xellia Pharmaceuticals ApS, Copenhagen, Denmark)

##### **3.1.5. Hranjivi mediji**

- Korišten je tekući medij: Luria-Bertani (LB): 10 g/L tripton, 5 g/L kvašćev ekstrakt, 10 g/L NaCl (Difco™, Lennox)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* i pulegona**

U ovom radu korišten je komercijalno pribavljeni pulegon i eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch (dalje u tekstu kao eterično ulje mikromerije) dobiveni destilacijom vodenom parom korištenjem Clevenger aparature. Udio pulegona u eteričnom ulju iznosi 59,7% i određen je analizom u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Pulegon i eterično ulje mikromerije otopljeni su u otapalu DMSO do konačne koncentracije 100 mg/mL. Iz te matične otopine pripravljene su konačne koncentracije eteričnog ulja i pulegona u LB-mediju. Odabrane su koncentracije 0,5 mg/mL koje su se u prethodnim istraživanjima napravljenim u laboratoriju pokazale kao učinkovite u djelovanju na rast biofilma, proizvodnju proteaza i pokretljivost (Kerner, 2021.; Sičić, 2020.).

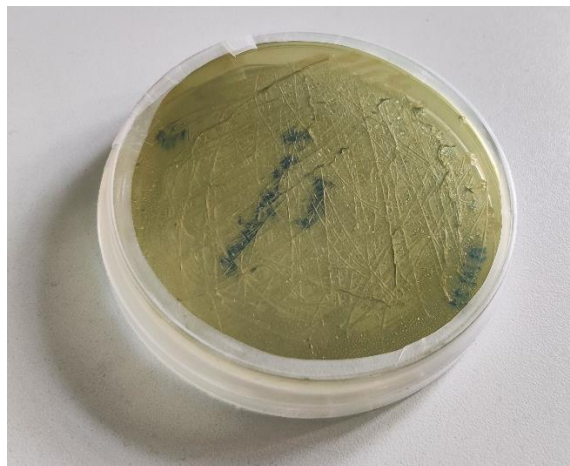
### **3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina**

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) tobramicina potrebna za inhibiciju rasta *Pseudomonas aeruginosa* određena je metodom serijskog razrjeđenja (Andrews, 2001). Antibiotik se geometrijskom progresijom razrjeđuje u nizu epruveta s tekućim hranjivim medijem. Mjerenje je provedeno za koncentracije 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L i 16 mg/mL. Nakon toga provedena je inokulacija 3 mL LB medija s noćnom kulturom *P. aeruginosa*, PAO1 u omjeru 1:100. Inkubacija se odvijala 24 h pri temperaturi od 37°C. Rezultat je određen ispitivanjem bistrine i stupnja замуćenja, pri čemu je MIK odrađen kao najniža koncentracija antibiotika koja inhibira vidljivi rast. Epruveta se promatra duž svoje osi naspram tamne podloge i uspoređuje s poredbenom suspenzijom. Poredbena suspenzija priprema se inokulacijom hranjivog medija bakterijskom kulturom *P. aeruginosa* PAO1.

### **3.2.3. Priprema i tretiranje bakterijske kulture s otopinama eteričnog ulja mikromerije, pulegona i tobramicina**

Ispitivanje učinka eteričnog ulja mikromerije, pulegona i tobramicina na sintezu piocijanina provedeno je prema prilagođenoj metodi rada Essar i sur., 1990. Prvi korak je priprema noćne

kulture bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Noćna kultura pripravljena je inokulacijom 5mL LB-medija s bakterijskom kulturom s Petrijeve ploče (slika 6). Kultura je inkubirana 21 sat pri temperaturi od 37°C u zračnoj tresilici (MaxQ 4000, Thermo scientific) na brzini od 200 rpm.



**Slika 6.** Bakterijska kultura *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 uzgojena u krutom LB-mediju.

U šest sterilnih Erlenmeyerovih tikvica (slika 7) od 100 mL alikvotirano je 20 mL LB-medija. U svaku pojedinu tikvicu dodan određeni volumen pripremljenih matičnih otopina prema shemi u Tablici 1. Koncentracije eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona u matičnim otopinama iznose 100 mg/mL. U ovom ispitivanju korišteni su volumeni od 100 µL kako bi se postigla koncentracija od 0,5 mg/mL. Tobramicin je dodan u konačnoj koncentraciji 0,5 mg/L. U svaku tikvicu dodano je 200 µL noćne kulture pri čemu se postiže razrjeđenje 1:100. Pripremljene otopine inkubiraju se 24 h pri temperaturi od 37°C u zračnoj tresilici (MaxQ 4000, Thermo scientific) na brzini 200 rpm.

TIKVICA	LB MEDIJ	<i>P. a.</i> PAO1	ETERIČNO ULJE	PULEGON	TOBRAMICIN
1	20 mL	200 µL	x	x	X
2	20 mL	200 µL	100 µL	x	X
3	20 mL	200 µL	x	100 µL	X
4	20 mL	200 µL	x	x	20 µL
5	20 mL	200 µL	100 µL	x	20 µL
6	20 mL	200 µL	x	100 µL	20 µL

**Tablica 1.** Shema priprave otopina



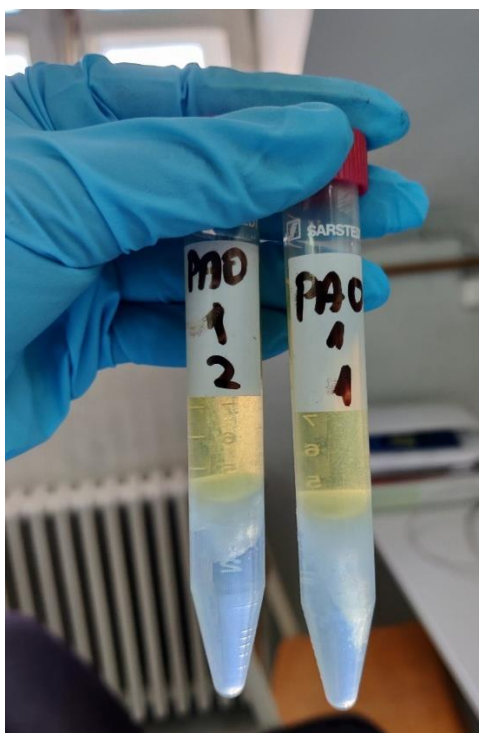
*Slika 7.* Šest Erlenmeyerovih tikvica s pripremljenim otopinama nakon inkubacije u trajanju od 24 h.

### **3.2.4. Određivanje vrijednosti optičke gustoće bakterijske kulture**

Optička gustoća pri valnoj duljini od 600 nm (engl. *optical density*, OD<sub>600</sub>) je vrijednost koja ukazuje na broj bakterijskih stanica u tekućem mediju. Nakon inkubacije uzet je alikvot od 350 µL kulture i nanesen na mikrotitarsku pločicu. Kao slijepa proba, kontrola sterilnosti, koristi se sam LB-medij. Vrijednost optičke gustoće spektrofotometrijski je određena mjerenjem apsorbancije pri 600 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer).

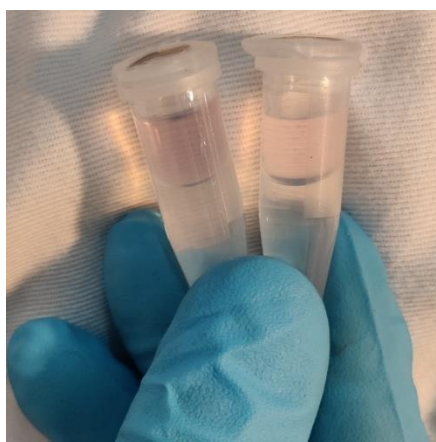
### **3.2.5. Ekstrakcija piocijanina**

Bakterijska kultura nakon inkubacije prenijeta je u osam Eppendorf epruveta, u svaku po 2 mL te su stanice istaložene centrifugiranjem 5 minuta na 16000 g stolnom centrifugom (5424R, Eppendorf). Nakon centrifugiranja odvojeno je 7,5 mL supernatanta u dvije epruvete od 15 mL. U svaku epruvetu dodano je 4,5 mL kloroforma. Epruvete su vorteksirane dva puta po 10 sekundi, a nakon toga centrifugirane 10 minuta na 3500 g centrifugom Jouan, Thermo Scientific. U donjem plavkastom sloju kloroforma (slika 8.) otopljen je piocijanin. Pomoću pipete odvojen je 1 mL plavkastog sloja u novu Eppendorf epruvetu od 1,5 mL.



**Slika 8.** Epruvete kulture *P.aeruginosa* PAO1 nakon centrifugiranja, ekstrahirani piocijanin plavkaste boje nalazi se u donjem sloju kloroforma

Dodano je 0,5 mL 0,2 M HCl. Epruvete su vorteksirane dva puta po 10 sekundi, a zatim centrifugirane 5 minuta na 16000 g u stolnoj centrifugi (5424R, Eppendorf). Nakon centrifugiranja odvojen je gornji vodeni sloj ružičaste boje (slika 9.) u Eppendorf epruvete od 1,5 mL. Na mikrotitarsku pločicu preneseno je 350  $\mu$ L otopine i izmjerena apsorbancija pri 520 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Kao slijepa proba koristi se 350  $\mu$ L 0,2M HCl.



**Slika 9.** Eppendorf epruvete nakon centrifugiranja s ekstrahiranim piocijaninom u gornjem sloju ružičaste boje.

### 3.2.6. Statistička analiza

Uspoređivanjem vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) netretirane bakterijske kulture *P. aeruginosa* PAO1 i kultura tretiranih eteričnim uljem mikromerije, pulegonom ili tobramicinom, samostalno ili u kombinaciji, možemo odrediti učinak na smanjenje rasta bakterijskih stanica. Vrijednosti  $OD_{600}$  za pojedinu tretiranu bakterijsku kulturu kao i za netretiranu bakterijsku kulturu dobivene su u tri neovisna pokusa. Svaki pokus proveden je u duplikatu. Za daljnju analizu koristila se aritmetička sredina neovisnih pokusa korigirana za vrijednost standardne devijacije. Dobivene vrijednosti tretiranih bakterijskih kultura tretiranih stavljaju se u odnos s vrijednosti netretirane bakterijske kulture prema formuli prikazanoj na slici 10. Rezultat je postotni udio broja stanica u odnosu na broj stanica u netretiranoj bakterijskoj kulturi.

$$\frac{OD_{600}(PAO1 + et. ulje; pul; tob)}{OD_{600}(PAO1)} \times 100$$

**Slika 10.** Formula za izračun relativne optičke gustoće bakterijske kulture tretirane eteričnim uljem mikromerije, pulegonom ili tobramicinom, tj. postotak od optičke gustoće netretirane kulture (PAO1)

Mjerenjem apsorbancije pri 520 nm određuje se količina ekstrahiranog piocijanina u bakterijskim kulturama tretiranim eteričnim uljem mikromerije, pulegonom i tobramicinom naspram netretirane kulture. Mjerenja su provedena u tri neovisna pokusa, a svaki pokus je proveden u duplikatu. Određena je aritmetička sredina neovisnih pokusa i korigirana je za vrijednost standardne devijacije. Kako bi se prikazao učinak eteričnog ulja mikromerije, pulegona i tobramicina na proizvodnju piocijanina dobivene vrijednosti za tretirane bakterijske kulture stavljaju se u odnos s vrijednostima za netretirane bakterijske kulture (PAO1) prema formuli na slici 11. Na taj način dobiva se postotni udio proizvedenog piocijanina u tretiranim bakterijskim kulturama u odnosu na netretirane bakterijske kulture.

$$\frac{A_{520}(PAO1 + et. ulje; pul; tob)}{A_{520}(PAO1)} \times 100$$

**Slika 11.** Formula za izračun relativne vrijednosti apsorbancije pri 520 nm bakterijske kulture tretirane eteričnim uljem, pulegonom ili tobramicina tj. postotni udio od apsorbancije netretirane bakterijske kulture (PAO1)

Normalizacijom vrijednosti apsorbancije na broj stanica dobivaju se vjerodostojniji podatci. Dobivene aritmetičke vrijednosti apsorbancije pri 520 nm potrebno je podijeliti s vrijednostima OD<sub>600</sub>. Rezultati tretiranih bakterijskih kultura, koji prikazuju utjecaj eteričnog ulja mikromerije, pulegona i tobramicina na proizvodnju piocijanina, iskazuju se u odnosu na normaliziranu vrijednost čiste bakterijske kulture *P. aeruginosa* PAO1 u LB-mediju prema formuli na slici 12. Na taj način dobivene vrijednosti prikazuju postotni udio proizvedenog piocijanina u odnosu na proizvedeni piocijanin u netretiranoj kulturi.

$$\frac{A_{520}/OD_{600}(PAO1 + et. ulje; pul; tob)}{A_{520}/OD_{600}(PAO1)} \times 100$$

**Slika 12.** Formula za izračun postotnog udjela proizvedenog piocijanina u tretiranim bakterijskim kulturama u odnosu na proizvedeni piocijanin u netretiranoj kulturi (PAO1).

## 4. REZULTATI

### 4.1 Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) tobramicina određena je na temelju bistrine i stupnja zamućenja, promatranjem epruveta duž svoje osi naspram tamne podloge i uspoređujući s poredbenom suspenzijom *P. aeruginosa* PAO1 koja nije bila tretirana. Kao što je vidljivo na slici 13 MIK iznosi između 8 i 16 mg/L. Za daljnji rad odabrana je subinhibitorna koncentracija od 0,5 mg/L za koju je u prethodnim istraživanjima u laboratoriju pokazano da smanjuje proizvodnju proteaza i pokretljivost, koji su pod izravnom kontrolom QS-a (Kerner, 2021.).



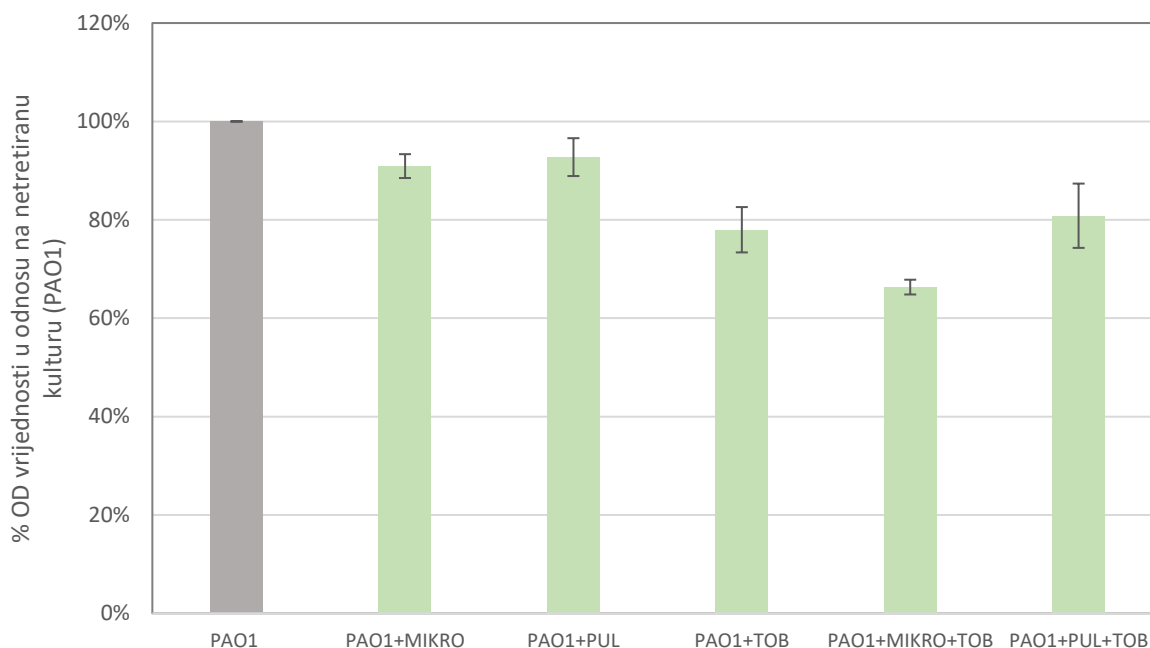
**Slika 13.** Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina metodom serijskog razrjeđenja praćenjem zamućenja otopina različitih koncentracija tobramicina (s lijeva na desno 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L i 16 mg/L) u odnosu na netretiranu kulturu (prva epruveta).

### 4.2. Učinak eteričnog ulja mikromerije, pulegona i tobramicina na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* PAO1

Slika 14 prikazuje učinak eteričnog ulja mikromerije, njegove monoterpenske komponente pulegona i aminoglikozidnog antibiotika tobramicina na smanjenje rasta planktonskih stanica



*P. aeruginosa* PAO1. Osim pojedinačnog učinka prikazan je i zajednički učinak eteričnog ulja mikromerije s tobramicinom, odnosno pulegona s tobramicinom.



**Slika 14.** Učinak eteričnog ulja mikromerije (MIKRO), pulegona (PUL), tobramicina (TOB) i njihovih kombinacija na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* PAO1. Prikazane su relativne vrijednosti optičke gustoće, odnosno postotni udjeli u odnosu na netretiranu kulturu (PAO1). Vrijednosti su iskazane u obliku aritmetičke sredine podataka dobivenih iz tri neovisna pokusa  $\pm$  standardna devijacija.

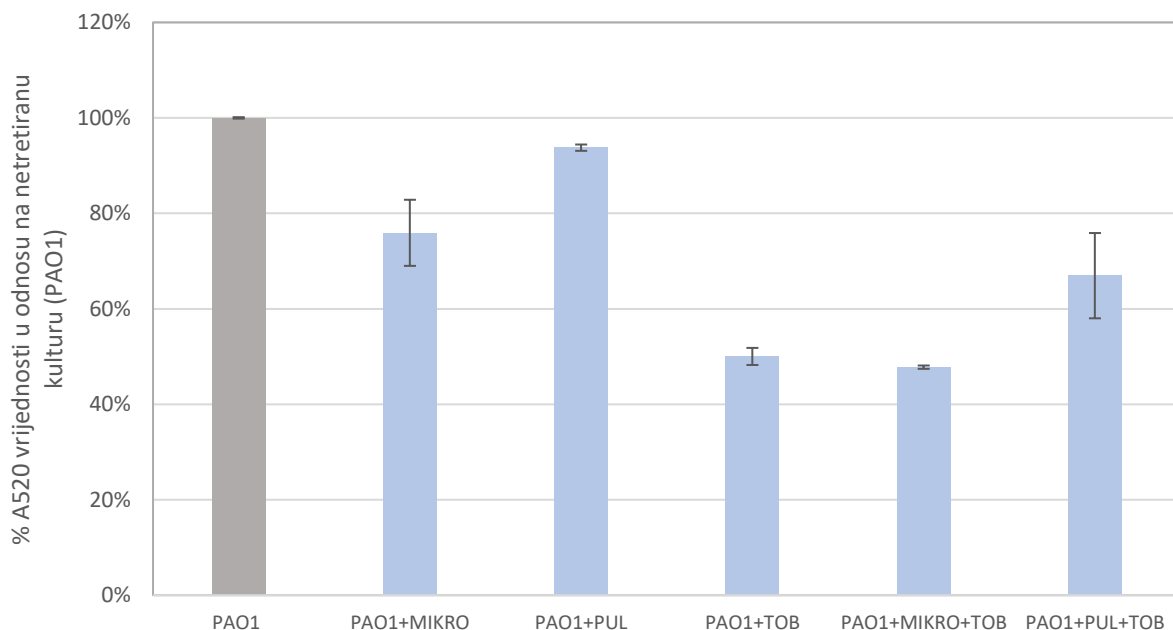
U bakterijskim kulturama tretiranim eteričnim uljem mikromerije, u koncentraciji od 0,5 mg/mL, rast planktonskih stanica reduciran je u prosjeku za  $9\% \pm 2,4\%$  u odnosu na rast planktonskih stanica u netretiranoj kulturi. Pulegon, također primijenjen u koncentraciji od 0,5 mg/mL, djeluje na smanjenje rasta planktonskih stanica približno jednako kao i eterično ulje mikromerije. Rezultati prikazuju smanjenje rasta planktonskih stanica za u prosjeku  $7\% \pm 3,8\%$  u odnosu na rast stanica u netretiranoj kulturi.

Kako bi se odredilo potencijalno sinergističko ili antagonističko djelovanje eteričnog ulja mikromerije ili pulegona u kombinaciji s tobramicinom, na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1, potrebno je odrediti djelovanje samog antibiotika tobramicina. Rezultati prikazuju da bakterijske kulture PAO1 tretirane tobramicinom, pri subinhibitornoj koncentraciji od 0,5 mg/L, pokazuju smanjenje rasta planktonskih stanica za u prosjeku  $22\% \pm 4,6\%$  u odnosu na netretiranu kulturu. Kod bakterijskih kultura tretiranih kombinacijom eteričnog ulja mikromerije (u koncentraciji od 0,5 mg/mL) i tobramicina (u koncentraciji od 0,5 mg/L) došlo je do smanjenja rasta planktonskih stanica za otprilike  $34\% \pm 1,5\%$  u odnosu

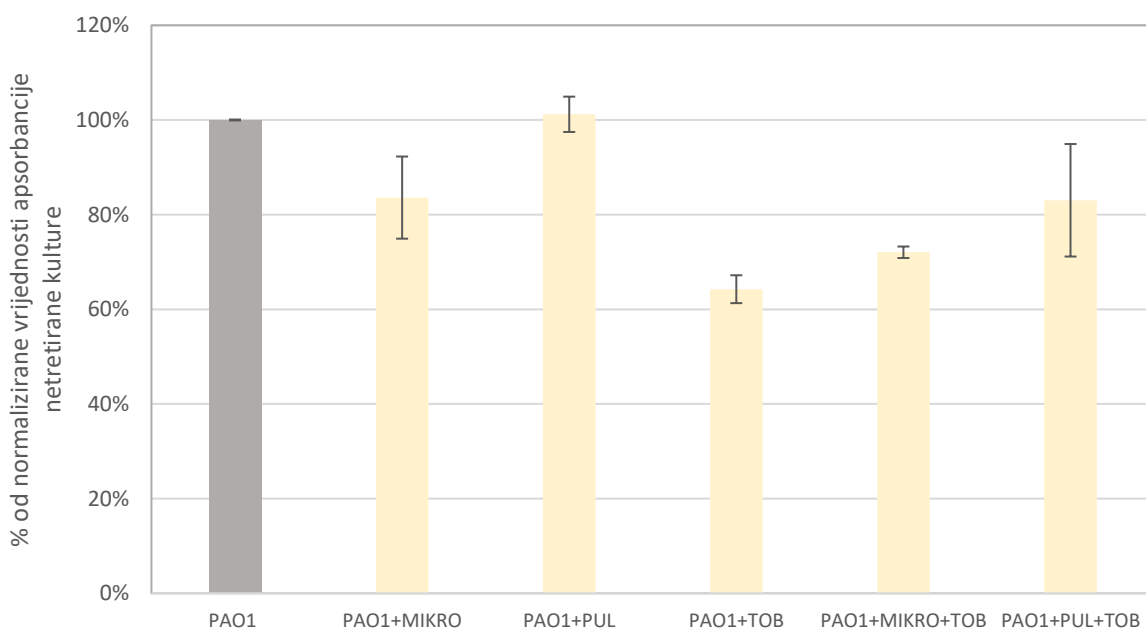
na netretiranu kulturu. Kombinacija eteričnog ulja mikromerije i tobramicina reducirala je rast planktonskih stanica 10-20% više nego samo eterično ulje i sam antibiotik. Tretiranje bakterijskih kultura kombinacijom pulegona (u koncentraciji 0,5 mg/mL) i tobramicina (u koncentraciji 0,5 mg/L) dovelo je do redukcije rasta bakterijskih stanica za otprilike  $19\% \pm 6,5\%$  u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu. Taj učinak veći je u odnosu na učinak samog pulegona koji je doveo do smanjenja za otprilike 7%, dok je učinak samog tobramicina približno jednak.

#### **4.3. Učinak eteričnog ulja mikromerije, pulegona i tobramicina na proizvodnju piocijanina**

Slika 15 prikazuje učinak eteričnog ulja mikromerije, njegove monoterpenske komponente pulegona i aminoglikozidnog antibiotika tobramicina na smanjenje proizvodnje piocijanina kod *P. aeruginosa* PAO1. Osim pojedinačnog učinka prikazan je i zajednički učinak eteričnog ulja mikromerije s tobramicinom, odnosno pulegona s tobramicinom.



a)



b)

**Slika 15.** Učinak eteričnog ulja mikromerije (MIKRO), pulegona (PUL), tobramicina (TOB) i njihovih kombinacija na proizvodnju pigmenta piocijanina u planktonskim stanicama bakterije *P. aeruginosa* PAO1. Vrijednosti su iskazane u obliku aritmetičke sredine podataka dobivenih iz tri neovisna pokusa ± standardna devijacija :

- a) Relativne vrijednosti apsorbancije pri 520 nm odnosno postotni udjeli u odnosu na  $A_{520}$  netretirane kulture (PAO1);
- b) Relativne vrijednosti  $A_{520}$  normaliziranih na broj bakterijskih stanica, odnosno postotni udjeli u odnosu na normaliziranu vrijednost apsorbancije netretirane bakterijske kulture (PAO1).

Spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri 520 nm određena je količina proizvedenog piocijanina u planktonskim stanicama bakterijske kulture *P. aeruginosa* PAO1. Tretiranjem bakterijske kulture eteričnim uljem mikromerije u koncentraciji od 0,5 mg/mL prema rezultatima prikazanim na slici 14a došlo je smanjenja proizvodnje piocijanina za otprilike  $24\% \pm 6,9\%$  u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu. Kod bakterijskih kultura tretiranih pulegomom u koncentraciji od 0,5 mg/mL došlo je do smanjenja proizvodnje piocijanina za otprilike  $6\% \pm 0,6\%$ . Odnosi normaliziranih vrijednosti (prema formuli na slici 11) tretiranih i netretiranih bakterijskih kultura prikazani su na slici 14b. Promatranjem tih vrijednosti učinak eteričnog ulja mikromerije na proizvodnju piocijanina *P. aeruginosa* PAO1 je nešto manji. Došlo je do smanjenja proizvodnje piocijanina za u prosjeku  $16\% \pm 5\%$  u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu. Prema rezultatima prikazanim na slici 14b piocijanin nije pokazao inhibitorni učinak, odnosno nije doveo do smanjenja proizvodnje piocijanina u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu.

Kao i kod proučavanja učinka kombinacije eteričnog ulja mikromerije ili pulegona i tobramicina na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1, za proučavanje učinka te kombinacije na proizvodnju piocijanina potrebno je proučiti učinak samog antibiotika. Tobramicin je u pokusu korišten u subinhibitornoj koncentraciji od 0,5 mg/L. Relativne vrijednosti apsorbancije bakterijske kulture tretirane tobramicinom, u odnosu na apsorbanciju same bakterijske kulture, prikazuju smanjenje proizvodnje piocijanina za oko  $50\% \pm 1,8\%$ . Normalizacijom vrijednosti na broj bakterijskih stanica smanjenje produkcije piocijanina, bakterijskih kultura tretiranih tobramicinom u odnosu na netretirane bakterijske kulture, iznosi oko  $36\% \pm 2,9\%$ . Kombinacija eteričnog ulja mikromerije (u koncentraciji od 0,5 mg/mL) i tobramicina (u koncentraciji od 0,5 mg/L) prema vrijednostima apsorbancije pri 520 nm dovodi do smanjenja proizvodnje piocijanina za oko  $52\% \pm 0,3\%$  u odnosu na proizvodnju piocijanina kod netretirane bakterijske kulture. Normalizacijom tih vrijednosti na broj bakterijskih stanica smanjenje proizvodnje piocijanina, bakterijskih kultura tretiranih kombinacijom eteričnog ulja mikromerije i tobramicina, iznosi oko  $28\% \pm 1,2\%$ . Učinak te kombinacije pokazao se nešto slabijim (za otprilike 8%) od učinka samog antibiotika dok je ipak veći (za otprilike 12%) od učinka samo eteričnog ulja mikromerije. Druga kombinacija, pulegon i tobramicin, prema vrijednostima apsorbancije pri 520 nm prikazuje smanjenje proizvodnje piocijanina za otprilike  $33\% \pm 8,9\%$  u odnosu na netretiranu kulturu. Dobiveni podatci odnose se na pulegon u koncentraciji od 0,5 mg/mL i tobramicin u koncentraciji od 0,5 mg/L. Normalizacija

vrijednosti na broj bakterijskih stanica dovodi do podataka o smanjenju produkcije piocijanina za oko  $17\% \pm 11,8\%$  u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu.

## 5. RASPRAVA

*Pseudomonas aeruginosa* kao svestrani oportunistički patogen može uzrokovati i akutne i kronične infekcije. Patogeni profil proizlazi iz genoma koji kodira velik broj faktora virulencije. Ima izvanrednu metaboličku fleksibilnost i sposobnost prilagodbe višestrukim stanjima, uključujući imunosni odgovor domaćina. Na temelju parametara kao što su incidencija, stopa smrtnosti, razvoj kronične bolesti, dostupnost terapije, korištenje zdravstvene skrbi i društveni utjecaj, infekcije s *P. aeruginosa* jedne su od onih s najvišim prioritetom za nadzor i epidemiološka istraživanja. Prirodna i stečena rezistencija na antibiotike dodatno otežava borbu s infekcijama uzrokovanim *P. aeruginosa*. Neracionalna primjena antibiotika dovela je do pojave višestruko rezistentnih sojeva. Visoka otpornost na niz antibiotika, uključujući beta-laktame, fluorokinolone i aminoglikozide, rezultirala je porastom stope smrtnosti (Jurado-Martíni sur., 2021; Chegini i sur., 2020; Tümmler, 2019). Sve te činjenice dovode do potrebe za istraživanjem alternativnih terapijskih mogućnosti. Iz tog razloga sve se više proučava antimikrobna aktivnost sastavnica eteričnih ulja. To su aromatične uljne tekućine dobivene iz biljnih materijala. Najčešće se dobivaju metodom destilacije vodenom parom (Prabuseenivasan i sur., 2006). Sastoje se od mnogih pojedinačnih spojeva koji doprinose farmakološkom djelovanju samog eteričnog ulja. Biljna porodica Lamiaceae jedna je od najraznovrsnijih i najraširenijih biljnih porodica, a njezina se ljekovita vrijednost uglavnom temelji na sastavu hlapljivih eteričnih ulja. Glavne bioaktivne komponente prisutne u eteričnim uljima ove biljne porodice su sekundarni metaboliti u koje spadaju terpeni, alkaloidi i fenolni spojevi (Hilfiger i sur., 2021.; Moumni i sur., 2020.). Jedna od biljaka koje pripadaju toj porodici je *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, višegodišnji polugrm široko rasprostranjen na području jugoistočne Europe. Kao i kod svih eteričnih ulja tako i kod ulja mikromerije varijabilnost sastava u ovisnosti je o mjestu rasta i načinu uzgoja biljke. Razvijaju se različiti kemotipovi, a među najzastupljenijim sastavnicama su piperitenon-oksid, pulegon i izopulegon. Pulegon je monoterpenski spoj za koji se smatra da pridonosi antimikrobnom djelovanju eteričnog ulja mikromerije (Salameh i sur., 2020.).

U ovom radu ispitan je pojedinačni učinak eteričnog ulja mikromerije i jedne od njegovih najzastupljenijih sastavnica pulegona u koncentraciji 0,5 mg/mL na rast planktonskih bakterijskih stanica vrste *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Rast planktonskih bakterijskih stanica određen je spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm. Rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju podjednak učinak samog eteričnog ulja mikromerije i njegove

komponente pulegona. Njihov učinak prema dobivenim vrijednostima nije velik, što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja (Boukhebt i sur., 2011). Pokazalo se da su gram negativne bakterije, kao što je *P. aeruginosa*, otpornije na djelovanje eteričnih ulja zbog prisutnosti hidrofilnih polisaharidnih lanaca u strukturi koji djeluju kao barijera lipofilnim komponentama eteričnog ulja.

Osim pojedinačnog, ispitivan je i potencijalni sinergistički učinak eteričnog ulja mikromerije i tobramicina, odnosno pulegona i tobramicina, na rast bakterijskih stanica. Tobramicin je aminoglikozidni antibiotik koji se koristi u terapiji liječenja infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*. Često se primjenjuje u obliku inhalata u višim dozama posebice kod kroničnih infekcija dišnih puteva osoba koje boluju od cistične fibroze (Tümmler, 2019). Velik broj sojeva *P. aeruginosa* osjetljiv je na tobramicin, ali postoji opasnost od razvoja rezistencije. Neki sojevi prijenosom genetičkog materijala ostvarili su stečenu rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike prijenosom enzima koji modificiraju aminoglikozide i smanjuju afinitet vezanja antibiotika na njegovo ciljno mjesto, a to je 30 S podjedinica ribosoma (Chegini i sur., 2020). U ovom radu korišten je soj *P. aeruginosa* PAO1 koji pokazuje osjetljivost na tobramicin. Određena je minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina, metodom mikrodilucije, u vrijednosti između 8 i 16 mg/L. Tobramicin se u ispitivanjima koristio u subinhibitornoj koncentraciji 0,5 mg/L. Eterično ulje mikromerije zajedno s tobramicinom pokazalo je sinergistički učinak na smanjenje rasta planktonskih stanica *P. aeruginose* PAO1. Rezultati su pokazali veći inhibitorni učinak ove kombinacije od učinka samog eteričnog ulja, odnosno samog antibiotika. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima prethodnih ispitivanja, koja su pokazala sinergistički učinak eteričnog ulja mikromerije i tobramicina na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* ATCC 27853 u svim ispitivanim koncentracijama (Sičić, 2020.). Zajednički učinak pulegona i tobramicina pokazao se manje djelotvornim od kombinacije eteričnog ulja i tobramicina. Djelovanje samog tobramicina pokazalo se jednakim djelovanju pulegona i tobramicina u kombinaciji. Pulegon nije prikazao sinergistički učinak s tobramicinom u smanjenju rasta planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1. Rezultati prijašnjih istraživanja na soju *P. aeruginosa* ATCC 27853 pokazali su da pulegon pri nižim koncentracijama može imati antagonistički učinak u odnosu na tobramicin čime mu smanjuje djelovanje, dok pri višim koncentracijama može imati aditivan učinak i na taj način pojačavati učinak tobramicina na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* (Sičić, 2020.).

Jedan od mehanizama kojima se *P. aeruginosa* bori s nepogodnim uvjetima je proizvodnja faktora virulencije. Ima sposobnost stvaranja velikog broja strukturnih i sekrecijskih faktora koji joj između ostalog omogućavaju izbjegavanje imunosnog odgovora domaćina. Važni su i za formiranje biofilma, jedne od ključnih strategija za preživljavanje vrsta tijekom neočekivanih promjena životnih uvjeta. Jedan od sekrecijskih faktora virulencije je pigment piocijanin. Osim učinka na formiranje biofilma, sudjeluje u staničnoj signalizaciji, prijenosu elektrona na različite oksidanse i preživljavanje u okruženju u kojem je smanjeno prisustvo elektron akceptora. U stanicama domaćina može uzrokovati oksidativan stres redukcijom molekularnog kisika i stvaranjem reaktivnih radikala. Istraživanja su pokazala veliki značaj prisustva piocijanina na virulentnost *P. aeruginosa* (Alatraktchi i sur., 2020).

U ovom radu ispitivan je i učinak eteričnog ulja mikromerije i pulegona u koncentracijama 0,5 mg/mL na proizvodnju piocijanina kod *P. aeruginosa*. Dobiveni rezultati pokazali su statistički značajan učinak samog eteričnog ulja mikromerije u koncentraciji 0,5 mg/mL na smanjenje proizvodnje piocijanina u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu. Iako je pulegon jedna od glavnih sastavnica eteričnog ulja mikromerije, njegovo samostalno djelovanje u koncentraciji 0,5 mg/mL dovelo je do porasta proizvodnje piocijanina. To se može objasniti kompleksnošću sastava eteričnog ulja i međudjelovanjem njegovih komponenti.

Uz pojedinačni učinak eteričnog ulja mikromerije i pulegona, ispitivan je i njihov potencijalni sinergistički učinak s tobramicinom. Tobramicin je korišten u subinhibitornoj koncentraciji od 0,5 mg/L. Usporedbom djelovanja kombinacije eteričnog ulja mikromerije (0,5 mg/mL) i tobramicina i samog tobramicina može se zamijetiti smanjenje učinka antibiotika. Došlo je do blagog smanjenja djelovanja tobramicina odnosno antagonističkog djelovanja eteričnog ulja mikromerije na inhibiciju proizvodnje piocijanina. Kombinacija pulegona i tobramicina pokazala se još manje učinkovitom pri koncentraciji pulegona od 0,5 mg/mL. Pulegon je pokazao svoj antagonistički učinak smanjujući djelovanje tobramicina na inhibiciju proizvodnje piocijanina bakterije *P. aeruginosa* PAO1. Rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim prilikom istraživanja djelovanja pulegona i eteričnog ulja mikromerije na formiranje biofilma *P. aeruginosa* ATCC 27853. Pokazali su antagonistički učinak u nižim koncentracijama koje su primijenjene u ovom istraživanju. Istraživanje koje se bavilo proučavanjem učinka eteričnog ulja mikromerije i tobramicina na proteolitičku aktivnost i pokretljivost bakterije *P. aeruginosa* PAO1 pokazalo je drugačije rezultate. Kombinacija eteričnog ulja mikromerije i tobramicina, u koncentracijama korištenim i u ovom istraživanju,



pokazala je sinergistički učinak na smanjenje proteolitičke aktivnosti i pokretljivosti. Zajedničko svojstvo proizvodnje pirocijanina, formiranja biofilma, proteolitičke aktivnosti i pokretljivosti je to što su pod kontrolom bakterijske međustanične komunikacije. Različito djelovanje komponenti eteričnog ulja na svojstva pod kontrolom QS-a ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjem mehanizama antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja. (Kerner, 2021.; Sčić, 2020.).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da eterično ulje mikromerije i pulegon u koncentraciji 0,5 mg/mL ostvaraju inhibitoran učinak na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1. U analizi njihovog potencijalnog sinergističkog djelovanja s tobramicinom pokazala se potreba za dodatnim istraživanjima kako bi se utvrdile optimalne koncentracije za postizanje tog učinka. U koncentraciji primijenjenoj u ovom radu eterično ulje mikromerije je pokazalo sinergistički učinak dok sami pulegon nije, iako je glavna sastavnica ovog eteričnog ulja. Za postizanje sinergističkog učinka bilo je važno međudjelovanje i drugih komponenti eteričnog ulja. Rezultati analize učinka eteričnog ulja mikromerije na proizvodnju pirocijanina *P. aeruginosa* PAO1 pokazuju postojanje inhibitornog djelovanja za koncentraciju eteričnog ulja 0,5 mg/mL, dok sam pulegon nije pokazao inhibitorni učinak. U ovom radu se koristila jedna koncentracija stoga postoji prostor za dodatna istraživanja. Kombinacije eteričnog ulja mikromerije odnosno pulegona s tobramicinom dovele su do smanjenja djelovanja antibiotika. Eterična ulja i njihove komponente pokazale su potencijal antimikrobnog djelovanja, ali i kompleksnost koju je nužno dodatno istražiti.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegon u koncentraciji od 0,5 mg/mL pokazali su inhibitorni učinak na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1.
- Eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, u koncentraciji od 0,5 mg/mL, pokazalo je sinergistički učinak s tobramicinom u subinhibitornoj koncentraciji od 0,5 mg/L na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1.
- Pulegon u koncentraciji od 0,5 µg/mL pokazao je značajnije sinergističko djelovanje s tobramicinom u subinhibitornoj koncentraciji od 0,5 mg/L na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1 u usporedbi s kombinacijom tobramicina i eteričnog ulja.
- Različiti učinci eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona u kombinaciji s tobramicinom na planktonske stanice upućuju na kompleksnost mehanizama antimikrobnog učinka eteričnih ulja.
- Eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch u koncentraciji od 0,5 mg/mL pokazalo je inhibitorni učinak na proizvodnju piocijanina *P. aeruginosa* PAO1.
- Pulegon u koncentraciji od 0,5 mg/mL nije pokazao inhibitorni učinak na proizvodnju piocijanina *P. aeruginosa* PAO1.
- Eterično ulje vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, odnosno pulegon, u koncentracijama 0,5 mg/mL, s tobramicinom u koncentraciji od 0,5 mg/L, doveli su do smanjenja učinka antibiotika.
- Rezultati ovog rada pokazali su antimikrobni potencijal eteričnih ulja i njihovih komponenti kao i važnost daljnjeg proučavanja njihovog antimikrobnog mehanizma za pomoć u borbi s infekcijama uzrokovanim *P. aeruginosa*.

## 7. LITERATURA

- Alatraktchi, F.A., Svendsen, W.E., Molin, S., Electrochemical detection of pyocyanin as a biomarker for pseudomonas aeruginosa: A focused review. *Sensors*, 2020., 20(18), 2.
- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48, 5–16.
- Boukhebti, H., Chaker, A.N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., Harzallah, D., Chemical composition and antibacterial activity of Mentha pulegium L. and Mentha spicata L. essential oils. *Pharm. Lett.*, 2011., 3(4),267-275
- Božovic, M., Pirolli, A., Ragno, R., Mentha suaveolens Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry. *Molecules*, 2015., 20(5), 8605-8633.
- Bukvički, D., Cirić, A., Soković, M., Vannini, L., Nissen, L., Novaković, M., Vujisić, L., Asakawa, Y., Marin, P.D., Micromeria thymifolia essential oil suppresses quorum-sensing signaling in pseudomonas aeruginosa. *Nat. Prod. Commun.* 2016., 11(12), 1903 – 1906.
- Cendra, M. del M., Torrents, E., Pseudomonas aeruginosa biofilms and their partners in crime. *Biotechnol. Adv.*, 2021., 49
- Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P., Shariati, A., Bacteriophage therapy against Pseudomonas aeruginosa biofilms: A review. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020., 19(1)
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000., 88(2).
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A. v., Davey, A.K., Chess-Williams, R., Kiefel, M.J., Arora, D., Grant, G.D., Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of Pseudomonas aeruginosa. *Toxins*, 2016., 8(8), 236.

- Hilfiger, L., Triaux, Z., Marcic, C., Héberlé, E., Emhemmed, F., Darbon, P., Marchioni, E., Petitjean, H., Charlet, A., Anti-Hyperalgesic Properties of Menthol and Pulegone. *Front. Pharmacol.*, 2021., 12, 753873.
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., McClean, S., *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021., 22(6), 3128
- Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 215-220.
- Kerner N. Utjecaj eteričnog ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* na proteolitičku aktivnost i pokretljivost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomski rad, 2021, Sveučilište u Zagrebu.
- Meirelles, L.A., Newman, D.K., Both toxic and beneficial effects of pyocyanin contribute to the lifecycle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 2018., 110(6).
- Mielko, K.A., Jabłoński, S.J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., Młynarz, P., Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019., 35(11), 178.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, 7, 39
- Moumni, S., Elaissi, A., Trabelsi, A., Merghni, A., Chraief, I., Jelassi, B., Chemli, R., Ferchichi, S., Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some lamiaceae species essential oils from Tunisia. *BMC Complementary Med. Ther.* 2020., 20(1), 103.
- Nur Ashakirin, S., Tripathy, M., Kumar Patil, U., Bakar Abdul Majeed, A., Alam, S., Darul Ehsan, S., 2017. Antimicrobial activity of essential oils: exploration on mechanism of bioactivity. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2017., 8(8), 3187-3193.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.J., Cheng, Z., Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.*, 2019., 37(1), 177-192.

- Pecarski, D.M., Knežević-Jugović, Z.D., Dimitrijević-Branković, S.I., Mihajilovski, K.R., Janković, S.M., Comparative analysis of the chemical composition and antimicrobial activities of some of lamiaceae family species and eucaliptus (*Eucaliptus globules* M). *Acta Period. Technol.* 2014.,45, 1-283.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary Altern. Med.* 2006.,6, 39.
- Rada, B., Lekstrom, K., Damian, S., Dupuy, C., Leto, T.L., The Pseudomonas Toxin Pyocyanin Inhibits the Dual Oxidase-Based Antimicrobial System as It Imposes Oxidative Stress on Airway Epithelial Cells . *The J. Immunol.*, 2008., 181(7), 4883-4893.
- Roy, A., Park, H.J., Abdul, Q.A., Jung, H.A., Choi, J.S., Pulegone exhibits anti-inflammatory activities through the regulation of NF- $\kappa$ b and Nrf-2 signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Nat. Prod. Sci.*, 2018., 24(1), 28–35.
- Saunders, S.H., Tse, E.C.M., Yates, M.D., Otero, F.J., Trammell, S.A., Stemp, E.D.A., Barton, J.K., Tender, L.M., Newman, D.K., Extracellular DNA Promotes Efficient Extracellular Electron Transfer by Pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Cell*, 2020., 182, 919-932.e19.
- Salameh N.,Shraim N.,Jaradat N.,El Masri M.,Adwan L.K'Aibni S.,Alkowni R.,Radwan A.,Abualhasan M.,Laranjo M. Screening of Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Micromeria fruticosa serpyllifolia* Volatile Oils: A Comparative Study of Plants Collected from Different Regions of West Bank, Palestine. *BioMed Res. Int.*, 2020., 2020
- Sičić I. Učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*. Diplomski rad, 2019, Sveučilište u Zagrebu.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., Jackson, R.W., *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011., 35(4), 652–680.

- Silveira, N.S. da, de Oliveira-Silva, G.L., de Lamanes, B.F., Prado, L.C.D.S., Bispo-da-Silva, L.B.,  
The aversive, anxiolytic-like, and verapamil-sensitive psychostimulant effects of pulegone.  
*Biol. Pharm. Bull.*, 2014., 37(5).
- Thi, M.T.T., Wibowo, D., Rehm, B.H.A., Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020.,  
21(22), 1-25.
- Tümmler, B., Emerging therapies against infections with Pseudomonas aeruginosa. *F1000Research*,  
2019., 8, 1371.
- Vladimir-Knežević, S., Kalocrossed d signera, Z., Blažević, N., Composition of the essential oil of  
Micromeria thymifolia (Scop.) Fritsch and its chemical variation. *Pharmazie*, 2000., 55(2).
- Živković, V., Kurevija, T., Haršanji Drenjančević, I., Bogdan, M., Tomić Paradžik, M., Talapko, J.,  
Drenjančević, D., Drenjancevic, H.I., Paradzik, T.M., To Biofilm or not to Biofilm?, *SEEMEDJ*,  
2018.,2(1), 12-19.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

*Pseudomonas aeruginosa* je oportunistički patogen koji dovodi do infekcija najčešće imunokompromitiranih osoba. Smatra se klinički najznačajnijom vrstom unutar roda *Pseudomonas*. Sposobnost stvaranja velikog broja strukturnih i sekrecijskih faktora virulencije kao i formiranje biofilma otežava liječenje infekcija *P. aeruginosa*. Sve veći razvoj bakterijske rezistencije kod *P. aeruginosa*, zbog neracionalne primjene antibiotika, dovodi do potrebe za istraživanjem alternativnih mogućnosti liječenja. Jedna od takvih mogućnosti je primjena eteričnih ulja. To su aromatične, hlapljive otopine kompleksnog sastava koje posjeduju antimikrobno djelovanje. U ovom radu ispitan je učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i njegove glavne komponente pulegona u koncentracijama od 0,5 mg/mL na rast planktonskih stanica i proizvodnju sekrecijskog faktora virulencije piocijanina kod *P. aeruginosa* PAO1. Osim njihovog pojedinačnog učinka ispitan je i potencijalni sinergistički učinak s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom u subinhibitornoj koncentraciji 0,5 mg/L.

Istraživanje učinka na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1 provedeno je spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm. Eterično ulje mikromerije i pulegon pokazali su inhibitorni učinak na rast planktonskih stanica. Eterično ulje mikromerije pokazalo je i sinergistički učinak s tobramicinom pojačavajući njegovo djelovanje. Kombinacija pulegona i tobramicina nije dovela do pojave značajnog sinergizma u inhibiciji rasta planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1. Ispitivanje učinka na proizvodnju piocijanina provedeno je spektrofotometrijskim mjerenjem ekstrahiranog piocijanina pri 520 nm. Eterično ulje mikromerije pokazalo je inhibitorni učinak, dok sami pulegon nije. Ispitivanja međudjelovanja tobramicina s eteričnim uljem i pulegom pokazala su njihov antagonistički učinak koji je doveo do smanjenja djelovanja tobramicina. Rezultati ovog rada pridonose boljem razumijevanju kompleksnosti i antimikrobnog potencijala eteričnih ulja.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that most commonly leads to infections of immunocompromised individuals. It is considered to be the most clinically significant species within the genus *Pseudomonas*. The ability to produce a large number of structural and secretory virulence factors and to form biofilm complicates the treatment of *P. aeruginosa* infections. There is a great need to explore alternative treatment options because of the increase in development of bacterial resistance in *P. aeruginosa*, due to the irrational use of antibiotics.

One of these alternative options is the use of essential oils. These are aromatic, volatile solutions of complex composition that possess antimicrobial activity. This study investigated the effect of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and its component pulegon in concentrations of 0,5 mg/mL on planktonic cell growth and production of virulence factor pyocyanin in *P. aeruginosa* PAO1. In addition to their individual effect, a potential synergistic effect with the aminoglycoside antibiotic tobramycin in subinhibitory concentration of 0,5 mg/L was also investigated.

The effect on the planktonic growth of *P. aeruginosa* PAO1 cells was measured spectrophotometrically at 600 nm. *Micromeria* essential oil and pulegon used in concentration of 0,5 mg/mL showed an inhibitory effect on planktonic cell growth. *Micromeria* essential oil also showed a synergistic effect with tobramycin by enhancing its effect on growth of *P. aeruginosa* PAO1 plankton cells. The combination of pulegone and tobramycin did not lead to significant synergism. The effect on production of pyocyanin by *P. aeruginosa* PAO1 was investigated by spectrophotometric measurements of extracted pyocyanin at 520 nm. *Micromeria* essential oil showed an inhibitory effect, while pulegon did not. Interaction of tobramycin with essential oil and pulegon showed their antagonistic effect leading to a decrease in the activity of tobramycin. The results of this work contribute to a better understanding of the complexity and antimicrobial potential of essential oils.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na proizvodnju pigmenta piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Zrinka Tolić

#### SAŽETAK

*Pseudomonas aeruginosa* je oportunistički patogen koji dovodi do infekcija najčešće imunokompromitiranih osoba. Smatra se klinički najznačajnijom vrstom unutar roda *Pseudomonas*. Sposobnost stvaranja velikog broja strukturnih i sekrecijskih faktora virulencije kao i formiranje biofilma otežava liječenje infekcija *P. aeruginosa*. Sve veći razvoj bakterijske rezistencije kod *P. aeruginosa*, zbog neracionalne primjene antibiotika, dovodi do potrebe za istraživanjem alternativnih mogućnosti liječenja. Jedna od takvih mogućnosti je primjena eteričnih ulja. To su aromatične, hlapljive otopine kompleksnog sastava koje posjeduju antimikrobno djelovanje. U ovom radu ispitan je učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i njegove glavne komponente pulegona u koncentracijama od 0,5 mg/mL na rast planktonskih stanica i proizvodnju sekrecijskog faktora virulencije piocijanina kod *P. aeruginosa* PAO1. Osim njihovog pojedinačnog učinka ispitan je i potencijalni sinergistički učinak s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom u subinhibitornoj koncentraciji 0,5 mg/L. Istraživanje učinka na rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1 provedeno je spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm. Eterično ulje mikromerije i pulegon pokazali su inhibitorni učinak na rast planktonskih stanica. Eterično ulje mikromerije pokazalo je i sinergistički učinak s tobramicinom pojačavajući njegovo djelovanje. Kombinacija pulegona i tobramicina nije dovela do pojave značajnog sinergizma u inhibiciji rasta planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1. Ispitivanje učinka na proizvodnju piocijanina provedeno je spektrofotometrijskim mjerenjem ekstrahiranog piocijanina pri 520 nm. Eterično ulje mikromerije pokazalo je inhibitorni učinak, dok sami pulegon nije. Ispitivanja međudjelovanja tobramicina s eteričnim uljem i pulegom pokazala su njihov antagonistički učinak koji je doveo do smanjenja djelovanja tobramicina. Rezultati ovog rada pridonose boljem razumijevanju kompleksnosti i antimikrobnog potencijala eteričnih ulja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 15 grafičkih prikaza, 1 tablica i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, pulegon, tobramicin, eterično ulje, piocijanin

Mentor: **Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Biochemistry and Molecular biology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **Effect of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone on production of pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

**Zrinka Tolić**

#### **SUMMARY**

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that most commonly leads to infections of immunocompromised individuals. It is considered to be the most clinically significant species within the genus *Pseudomonas*. The ability to produce a large number of structural and secretory virulence factors and to form biofilm complicates the treatment of *P. aeruginosa* infections. There is a great need to explore alternative treatment options because of the increase in development of bacterial resistance in *P. aeruginosa*, due to the irrational use of antibiotics. One of these alternative options is the use of essential oils. These are aromatic, volatile solutions of complex composition that possess antimicrobial activity. This study investigated the effect of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and its component pulegone in concentrations of 0,5 mg/mL on planktonic cell growth and production of virulence factor pyocyanin in *P. aeruginosa* PAO1. In addition to their individual effect, a potential synergistic effect with the aminoglycoside antibiotic tobramycin in subinhibitory concentration of 0,5 mg/L was also investigated. The effect on the planktonic growth of *P. aeruginosa* PAO1 cells was measured spectrophotometrically at 600 nm. *Micromeria* essential oil and pulegone used in concentration of 0,5 mg/mL showed an inhibitory effect on planktonic cell growth. *Micromeria* essential oil also showed a synergistic effect with tobramycin by enhancing its effect on growth of *P. aeruginosa* PAO1 plankton cells. The combination of pulegone and tobramycin did not lead to significant synergism. The effect on production of pyocyanin by *P. aeruginosa* PAO1 was investigated by spectrophotometric measurements of extracted pyocyanin at 520 nm. *Micromeria* essential oil showed an inhibitory effect, while pulegone did not. Interaction of tobramycin with essential oil and pulegone showed their antagonistic effect leading to a decrease in the activity of tobramycin. The results of this work contribute to a better understanding of the complexity and antimicrobial potential of essential oils.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 15 figures, 1 table and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, essential oil, *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, pulegone, tobramycin, pyocyanin

Mentor: **Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Thesis accepted: June 2022