Učinak eteričnog ulja vrste Micromeria thymifolia (Scop.) Fritsch i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije P. aeruginosa

Sičić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:079735

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Iva Sičić

Učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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 svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na uloženom trudu i vremenu, pruženoj pomoći, a ponajviše znanju koje mi je prenijela tijekom izrade ovog rada. Također bih htjela zahvaliti kolegici i prijateljici Dori Koprivčić što je sa mnom podijelila ovo iskustvo.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. *Pseudomonas aeruginosa* 1
1.1.1. Klinički značaj 2
1.1.2. Terapijski pristup 3
1.1.3. Biofilm i mehanizmi rezistencije biofilma na antibiotike 4
1.1.4. Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*) 7

1.2. Eterična ulja 9
1.2.1. Antibakterijski i antibiofilm učinak eteričnih ulja 10
1.2.2. Eterično ulje vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch 11
1.2.3. Pulegon 11

2. OBRAZLOŽENJE TEME 13

3. MATERIJALI I METODE 14

3.1. Materijali 14
3.1.1. Bakterije 14
3.1.2. Standardne kemikalije i otopine 14
3.1.3. Eterično ulje i komponente 14
3.1.4. Antibiotici 15
3.1.5. Filteri za sterilizaciju 15
3.1.6. Hranjivi mediji 15

3.2. Metode 15
3.2.1. Priprava otopina pulegona i eteričnog ulja mikromerije 15
3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije 16
3.2.3. Ispitivanje učinka eteričnog ulja mikromerije i pulegona na stvaranje biofilma 16
3.2.4. Ispitivanje učinka eteričnog ulja mikromerije i pulegona s tobramicinom na formirani biofilm 18
3.2.5. Statistička analiza 20

4. REZULTATI 21

4.1. Minimalna inhibitorna koncentracija 21

4.2. Učinak eteričnog ulja mikromerije na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa* .. 22

4.3. Učinak pulegona na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa* 26

4.4. Učinak eteričnog ulja mikromerije i tobramicina na formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa* 30

4.5. Učinak pulegona i tobramicina na formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa* 33

5. RASPRAVA 36

6. ZAKLJUČAK 41

7. LITERATURA 42

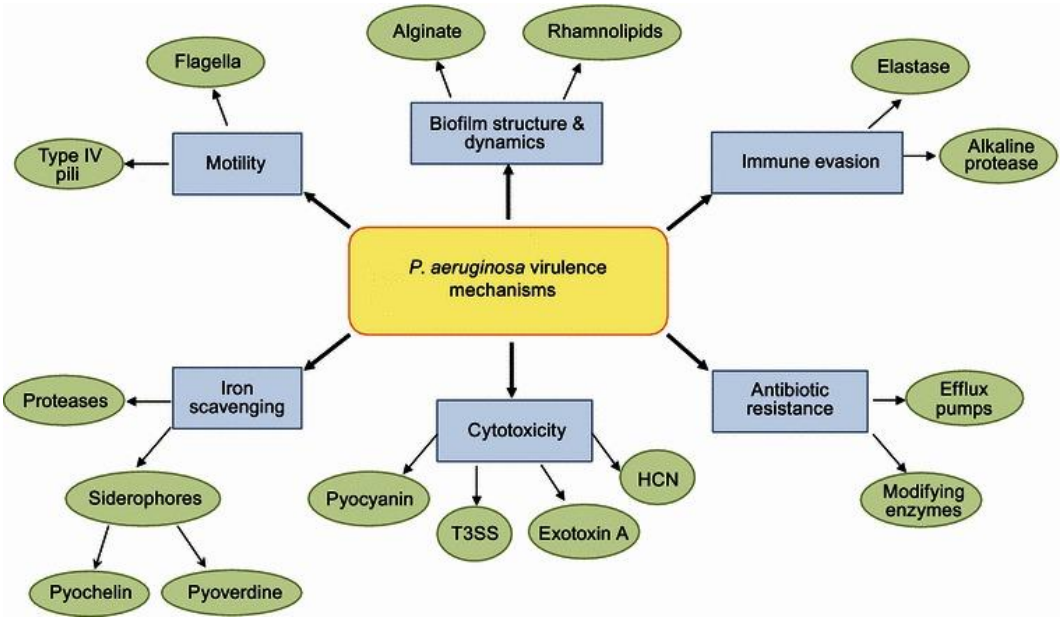
8. SAŽETAK/SUMMARY 47

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (grč. *pseudo* – lažan, lažno i *monas* – jedinka, lat. *aeruginosa* – pun bakrene hrđe, zelen) je bakterijska vrsta roda *Pseudomonas*, rod aerobnih gram-negativnih štapića, ubikvitarno prisutnih u tlu, vodi, vegetaciji i materijalu nastalom organskim raspadom, te mogu biti dio normalne flore kod zdravih pojedinaca. *Pseudomonas* je rod nefermentativnih bakterija, oportunističkih patogena ljudi, životinja i biljaka. Bakterije posjeduju enzime citokrom-oksidazu i katalazu, te polisaharidnu kapsulu. Većina ih je mezofilna s optimalnom temperaturom rasta i razvoja između 30°C i 37°C, ali pojedine se vrste mogu razmožavati na 4°C do 42°C. *P. aeruginosa* izaziva oportunističke infekcije, osobito kod ljudi s oslabljenim ili oštećenim imunosnim sustavom, a često se i povezuje s hospitalizacijom pa je jedan od najznačajnijih uzročnika bolničkih infekcija. Posjeduje velik broj čimbenika virulencije, a za sustavnu toksičnost ključni su lipopolisaharid (LPS) i egzotoksin A. *P. aeruginosa* je bakterija prilično otporna na antimikrobnu terapiju i često se pojavljuju izuzetno rezistentni sojevi. Zbog toga je važno provoditi testove osjetljivosti pojedinog soja na antibiotike na temelju čega se odabire prikladna terapija. Također stvara vodotopljive pigmente: piocijanin (plavi), pioverdin (žuti), piorubin (crveni) i piomelanin (crni). Čimbenici virulencije *P. aeruginosa* mogu se podijeliti na strukturne i sekrecijske. Strukturni čimbenici vezani uz staničnu površinu su flagela (polarni bič), pili (fimbrije), LPS (ima glavnu ulogu u etiologiji sepse). Sekrecijski čimbenici virulencije su izvanstanični produkti (enzimi, hemolizin, egzotoksin A), proteini tipa III, signalne molekule i alginat. Slika 1 prikazuje podjelu osnovnih mehanizama virulencije *P. aeruginosa.* Zbog mogućnosti prilagodbe na različite uvjete *P. aeruginosa* može se pronaći i u dezinficijensima, kremama, sapunu, tekućinama za ispiranje, kapima za oči, te u otopinama i opremi za dijalizu, ali i u ovlaživačima zraka, sanitarnim odvodima, kadama, hidroterapijskim bazenima (Kalenić i sur., 2013).



Slika 1. Mehanizmi virulencije *Pseudomonas aeruginosa* (preuzeto iz Lee i Zhang, 2014).

1.1.1. Klinički značaj

P. aeruginosa uzročnik je oportunističkih infekcija kod osoba s kompromitiranim imunosnim sustavom (to uključuje osobe oboljele od cistične fibroze, neutropenije, hipogamaglobulinemije, dijabetesa, bolesnika s karcinomom ili AIDS-om), kao i kod osoba s oštećenim fiziološkim barijerama (rane, opekline, kirurški zahvati, kateterizacija mokraćnog mjehura) (Kalenić i sur., 2013). Osobe sa zdravim imunosnim sustavom nemaju rizik od ozbiljnih infekcija. Svi organski sustavi mogu biti zahvaćeni, ali ipak najčešće uzrokuje infekcije uha („plivačko uho“), oka (keratitis), rana, opeklina, kronične infekcije dišnog sustava koje se uglavnom javljaju kod pacijenata s cističnom fibrozom i drugim kroničnim opstruktivnim bolestima, infekcije mokraćnog sustava, kože i mekih tkiva, bakterijemiju i sepsu (Carroll i sur., 2016). Tijek infekcije može se opisati u nekoliko koraka. Najprije dolazi do bakterijske kolonizacije na koži ili sluznicama procesom adherencije, zatim je moguća daljnja invazija tkiva i organskih sustava, nastanak diseminirane bolesti, bakterijemije i sepse (Kalenić i sur., 2013).

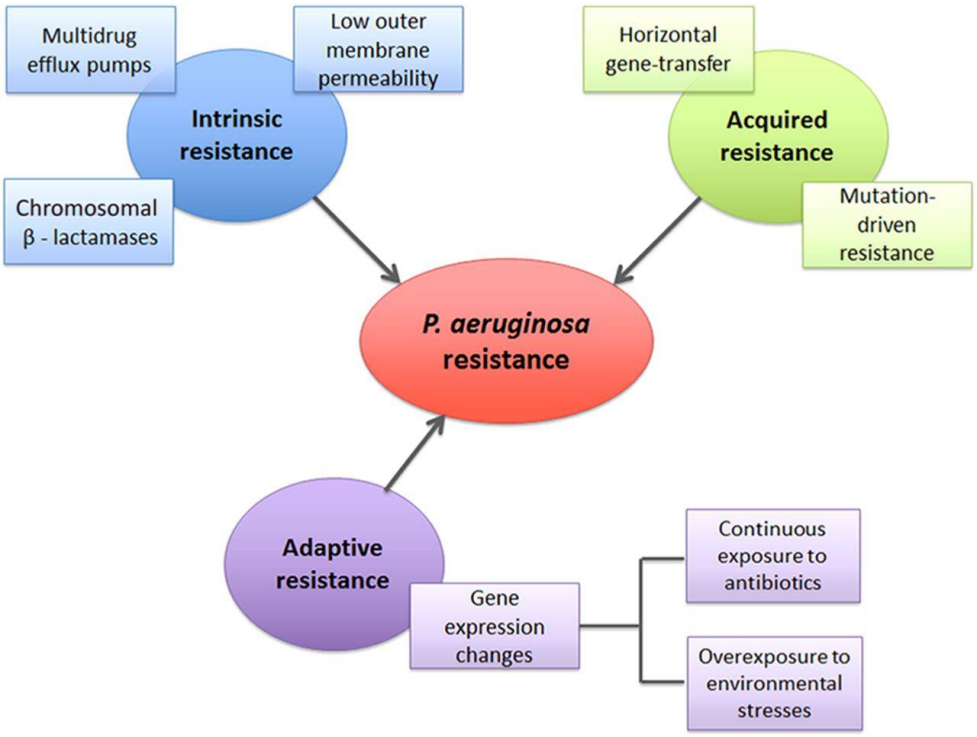
Infekcija je vrlo često povezana s hospitalizacijom te je *P. aeruginosa* jedan od najznačajnijih uzročnika bolničkih infekcija visoke stope smrtnosti (zbog bakterijemije i sepse). Uz to moguće su i endovaskularne infekcije, odnosno infektivni endokarditis koji većinom

nastaje u ovisnika o intravenskim opojnim drogama i bolesnika s umjetnim srčanim zaliscima. Česta je i kolonizacija respiratornog trakta te nastanak akutne pneumonije uglavnom kod pacijenata na mehaničkoj ventilaciji (eng. *ventilator associated pneumonia,* VAP) koja je glavni uzrok mortaliteta i morbiditeta u jedinicama intenzivne njege (Gužvinec i sur., 2012).

Do stvaranja biofilma dolazi kod kroničnih infekcija što upućuje na progresiju i perzistenciju. Infekcija koju prati stvaranje biofilma je najčešća kod pacijenata s cističnom fibrozom i drugim kroničnim opstruktivnim plućnim bolestima kao i kod pacijenata s dijabetičkim kroničnim ranama. Ovakve je infekcije najčešće teže detektirati i tretirati (Mulcahy i sur., 2014).

1.1.2. Terapijski pristup

Za liječenje infekcija izazvanih *P. aeruginosa* ključna je pravovremena i prikladna terapija antibioticima. Problem predstavljaju brojni urođeni i stečeni mehanizmi rezistencije – slaba propusnost stanične stijenke, efluks pumpe, promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika, stvaranje enzima koji razgrađuju antibiotike (β-laktamaze, cefalosporinaze, aminoglikozidaze). Dolazi i do pojave višestruko rezistentnih sojeva koji su otporni na barem jedan antibiotik iz tri ili više grupa zbog kombiniranih mehanizama rezistencije. Višestruka rezistencija na antibiotike kod *P. aeruginosa* je u stalnom porastu i dodatan je izazov u liječenju. *Pseudomonas* je bakterija čije je infekcije zbog visokog stupnja mogućnosti prilagodbe na različite ekstremne životne uvjete, širokog spektra čimbenika virulencije, antimikrobne rezistencije i pojave višestruko rezistentnih sojeva teško liječiti. Slika 2 shematski prikazuje kategorije mehanizama rezistencije i najvažnije primjere svake kategorije.



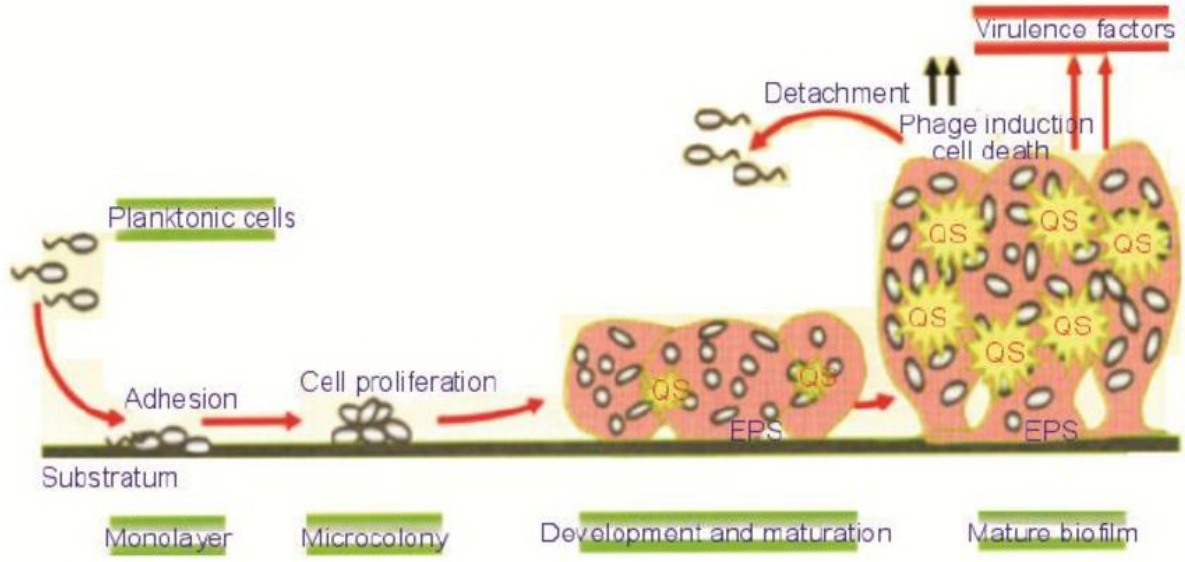
Slika 2. Shematski prikaz osnovnih mehanizama rezistencije bakterije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Pires i sur., 2015).

Antibiotici izbora za infekcije *P. aeruginosa* su penicilini (piperacilin, karbenicilin), cefalosporini III. i IV. generacije (ceftazidim, cefoperazon, cefepim), karbapenemi (imipenem, meropenem, doripenem), monobaktam aztreonam i fluorokinoloni (ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin). Moguća je i primjena aminoglikozida (amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramicin), ali ne kao monoterapija već kao dio kombinirane terapije u slučaju ozbiljnih infekcija. Zadnji izbor bio bi kolistin (polimiksin E) za liječenje teških infekcija (Gužvinec i sur., 2012).

1.1.3. Biofilm i mehanizmi rezistencije biofilma na antibiotike

Biofilm čine nakupine bakterijskih stanica vezanih na površinu pomoću egzopolisaharida koje su proizvele. Stanice unutar biofilma se razlikuju od planktonskih stanica po mnogočemu – između ostalog imaju i povećanu otpornost na djelovanje antibiotika. Otpornost može biti prouzrokovana fizičkim i kemijskim svojstvima egzopolisaharida ili drugim čimbenicima (Mah i O'Toole, 2001).

P. aeruginosa stvara biofilm u nekoliko faza. Najprije se planktonske stanice prihvaćaju za podlogu i formiraju mikrokolonije koje počinju proizvoditi izvanstanični matriks. Pod utjecajem stimulirajućih faktora doći će do sazrijevanja biofilma što će u konačnici dovesti do prostorne diferencijacije biofima u gljivaste strukture. Iz te se strukture stanice mogu odvojiti i nastaviti planktonski način života što je ključno za razvoj novog biofilma na novoj podlozi. Do disperzije biofilma može doći pasivnim odvajanjem većeg ili manjeg dijela biofilma koji je dosegnuo kritičnu veličinu (Lee i Yoon, 2017; De Kievit, 2009). Na slici 3 prikazan je proces nastanka biofilma. Kao što se vidi na slici to je cikličan proces, odnosno biofilm ima potencijal širenja i stvaranja novog biofilma na drugom mjestu što je vrlo važno za razvoj infekcije.



Slika 3. Stvaranje biofilma bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (preuzeto iz Høiby i sur., 2011).

Mehanizmi rezistencije biofilma bakterije *P. aeruginosa* na antibiotike su:

1) **Ograničen penetracija antibiotika kroz matriks biofilma** – Biofilm matriks neće potpuno spriječiti difuziju antibiotika, ali može ograničiti prodor zbog vezanja antibiotika na komponente matriksa ili enzimske razgradnje (npr. β-laktamazama) zbog nakupljanja enzima u matriksu. Ipak, moguće je da dođe do zasićenja veznih mjesta u matriksu te da ovaj mehanizam tolerancije bude samo privremen. Brojne su studije pokazale povezanost povećane proizvodnje biofilm matriksa i visoko rezistentnih sojeva koje uzrokuju ozbiljne infekcije.
2) **Heterogenost metabolizma i rasta bakterija** – Biofilm je prostorno heterogen. Bakterije na periferiji imaju visoku, dok bakterije u sredini imaju nisku ili čak nikakvu metaboličku aktivnost. Do ovoga dolazi zbog toga što bakterije na periferiji troše kisik

i nutrijente te ne ostaje dovoljno za bakterije u središtu biofilma. Zbog toga dolazi do inaktivacije važnih meta antibiotika. Primjerice zbog smanjene sinteze proteina smanjena je učinkovitost inhibitora sinteze proteina (npr. aminoglikozida), smanjena je sinteza DNA pa je smanjena i učinkovitost kinolona, a smanjena proizvodnja peptidoglikana ima učinak na smanjenje učinkovitosti beta-laktama.

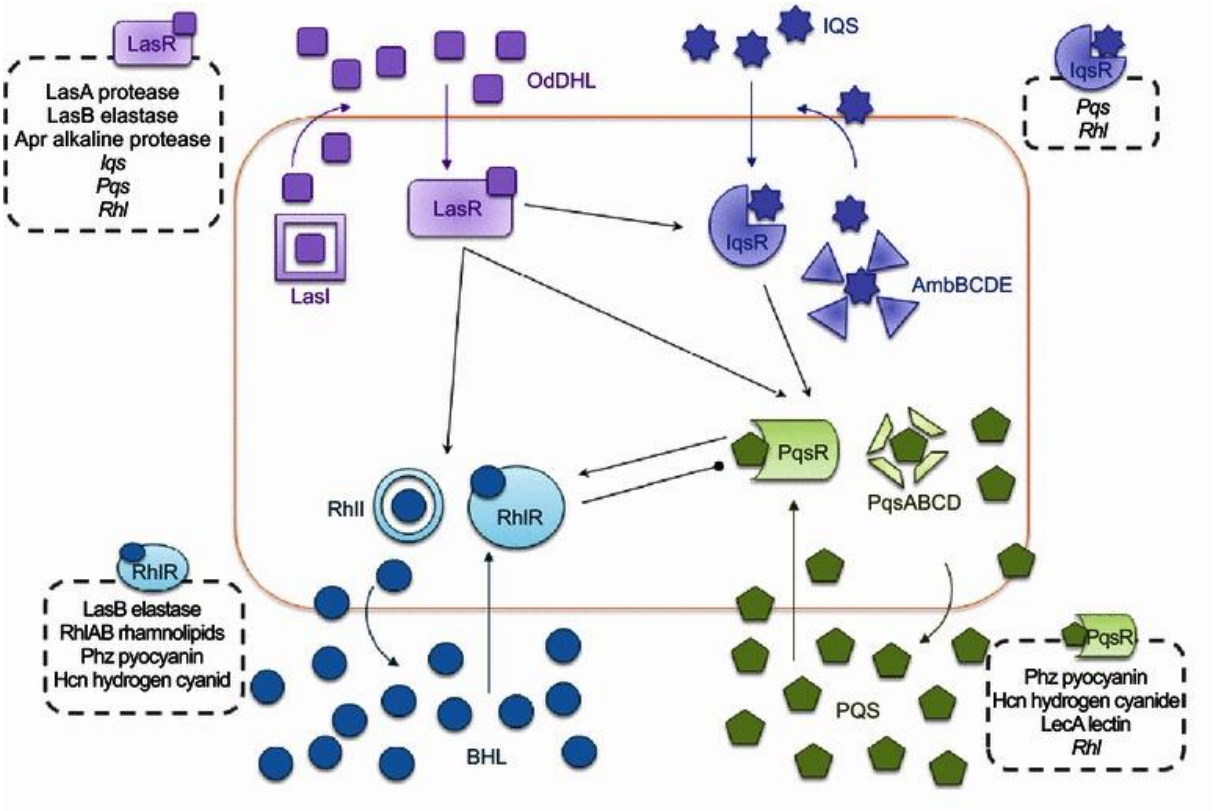
3) **Stresni odgovor** – Uslijed nedostatka nutrijenata i željeza ili agresivnih okolišnih događaja (temperaturni šok, promjena pH, oksidativni stres) dolazi do stresnog odgovora. Indukcijom ekspresije različitih gena povećan je antioksidativni kapacitet biofilma i tolerancija na biocide.
4) **Perzistentne stanice** – stanice koje su zastupljene u biofilmu svega 0,01%. To su stanice koje se dijele sporo ili se uopće ne dijele. Vjerojatno nastaju diferencijacijom stanica u stanje mirovanja (engl. *dormant state).* Zbog smanjenog opsega metabolizma ovih stanica onemogućeno je djelovanje antibiotika na osnovne stanične procese (npr. replikacija, transkripcija, sinteza proteina i stanične stijenke). Ove stanice se nakon završetka liječenja antibioticima mogu vratiti u vegetativno stanje i ponovno pokrenuti infekciju.
5) **Ekspresija specifičnih gena** – postoje specifični geni koji se eksprimiraju u biofilmu bakterije i posreduju u razvoju rezistencije na antibiotike. Transkripcijski faktor BrlR (od engl. *Biofilm resistance locus Regulator*) ključan je faktor za modulaciju osjetljivosti biofilma *P. aeruginosa* na učinak antibiotika. BrlR inducira transkripciju gena za efluks pumpe kodirane operonima *maxAB-oprM* i *mexEF-oprN*. Pojačana ekspresija efluks pumpi pridonosi rezistenciji jer onemogućuje dolazak molekule antibiotika do veznog mjesta. Do indukcije efluks pumpi može doći i uslijed različitih oblika sresa – oksidativni stres (indukcija preko MexXY-OprM), nitrozativnog stresa (idukcija preko MexEF-OprN) ili membranskih oštećenja. BrlR također utječe i na ekspresiju gena koji reguliraju proizvodnju lipopolisaharida i sastav membranskih proteina, metabolizam te stvaranje energije.
6) **Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*, QS)** – Uloga QS-a u rezistenciji biofilma na antibiotike još nije u potpunosti poznata. QS kontrolira ekspresiju gena koji kodiraju za superoksid-dismutaze i katalaze (enzimi koji biofilm štite od štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta). Ukoliko dođe do poremećaja u signalnom putu QS-a javlja se tanji biofilm i smanjena proizvodnja egzopolisaharida.

Uslijed svih spomenutih mehanizama rezistencije biofilma na antibiotičku terapiju javlja se potreba za primjenom većih koncentracija antibiotika što automatski znači i povećan rizik od pojave toksičnih nuspojava i dodatnih zdravstvenih komplikacija. Potrebno je pronaći nove pristupe liječenju infekcija praćenih razvojem biofilma – to mogu biti kombinacije antibiotika ili upotreba adjuvansa čija je uloga povećanje učinkovitosti antibiotika (Ciofu i Tolkien-Nielsen, 2019; Singh i sur., 2017). Problem je što su istraživanja novih antibiotika svedena na minimum pa je potrebno pronaći optimalna rješenja s već dostupnim lijekovima.

1.1.4. Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*)

Mikroorganizmi mogu egzistirati u dva različita oblika – kao planktonske individualne stanice ili formirati sesilni oblik zajednice poznatiji kao biofilm. Biofilm se sastoji od stanica mikroorganizama uklopljenih u izvanstanični matriks, a cijela je zajednica vezana za površinu. Formirani biofilm je genetički i okolišno različit od planktonskih stanica što mu omogućava značajnu zaštitu od okoličnog stresa i stanica imunosnog sustava te rezistenciju na antibiotike. Biofilm se smatra ključnim za razvoj ozbiljnih infekcija. Izvanstanični matriks proizvode bakterijske stanice unutar biofilma i on čini čak do 90% biofilma. Matriks se sastoji od egzopolisaharida, izvanstanične DNA (engl. *extracellular DNA*, eDNA), RNA, proteina i lipida. Izvanstanični matriks ima ulogu adheziva, ali stvara i mehaničku barijeru kod bakterijskih stanica. Glavne sastavnice matriksa biofilma *P. aeruginosa* su egzopolisaharidi Psl, Pel i alginat koji su ključni za strukturu biofilma te eDNA. Važne su i proteinske komponente samih stanica kao što su flagele koje pridonose adherenciji i pili tipa 4 koji su ključni u formiranju gljivastih struktura koje se izdižu iznad površine. Sve važne korake u stvaranju biofilma kontroliraju signalni putevi bakterijske međustanične komunikacije, odnosno *quorum sensing* (QS) (Lee i Yoon, 2017).

QS sustavi reguliraju gensku ekspresiju kroz proizvodnju malih difuzibilnih molekula – autoinduktora. Više od 10% gena *P. aeruginosa* regulirano je preko QS-a. Većinom su to geni povezani s proizvodnjom faktora virulencije, pokretljivošću, razvojem biofilma, antimikrobnom rezistencijom i prilagodbom metabolizma na stresne uvjete u okolišu. Kod bakterije *P. aeruginosa* poznata su četiri QS signalna puta – Las, Rhl, Pqs i IQS. Svi signalni putevi povezani su u hijerarhijsku mrežu. Sustav Las nalazi se na vrhu kaskade i pozitivno regulira sve ostale QS sustave (Moradali i sur., 2017). Slika 4 prikazuje hijerarhiju QS signalnih puteva, odnosno njihovu međusobnu povezanost i regulaciju.



Slika 4. Hijerarhija signalnih puteva kod *P. aeruginosa* i regulacija ekspresije faktora virulencije (preuzeto iz Lee i Zhang, 2014).

Autoinduktor sintaze (LasI, RhlI, PqsABCDH) kao odgovor na podražaje i stres iz okoliša proizvode autoinduktore HSL (3-okso-C12-homoserin lakton), BHL (N-butirilhomoserin lakton) i PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon). Autoinduktori se mogu nalaziti izvan i unutar stanice, a QS signalnim putevima se regulira njihova koncentracija. Autoinduktori se zatim vežu na transkripcijske faktore (LasR, RhlR, PqsR) koji potiču ekspresiju različitih gena. Singalnim sustavom Las se aktiviraju geni koji kodiraju sintezu proteaze LasA, elastaze LasB i alkane proteaze. Također se tim signalnim sustavom reguliraju ostali signalni sustavi. Putem sustava Rhl se aktiviraju geni koji kodiraju sintezu elastaze LasB, ramnolipida (održavaju arhitekturu biofilma stvarajući šupljine kojima se omogućuje protok vode i nutrijenata, pomažu u stvaranju gljivastih struktura i kasniju disperziju biofilma) i piocijanina. Signalnim sustavom Pqs aktiviraju se geni koji kodiraju piocijanin i lecitin. Signalni put IQS je najmanje istražen (Moradali i sur., 2017; Lee i Zhang, 2014).

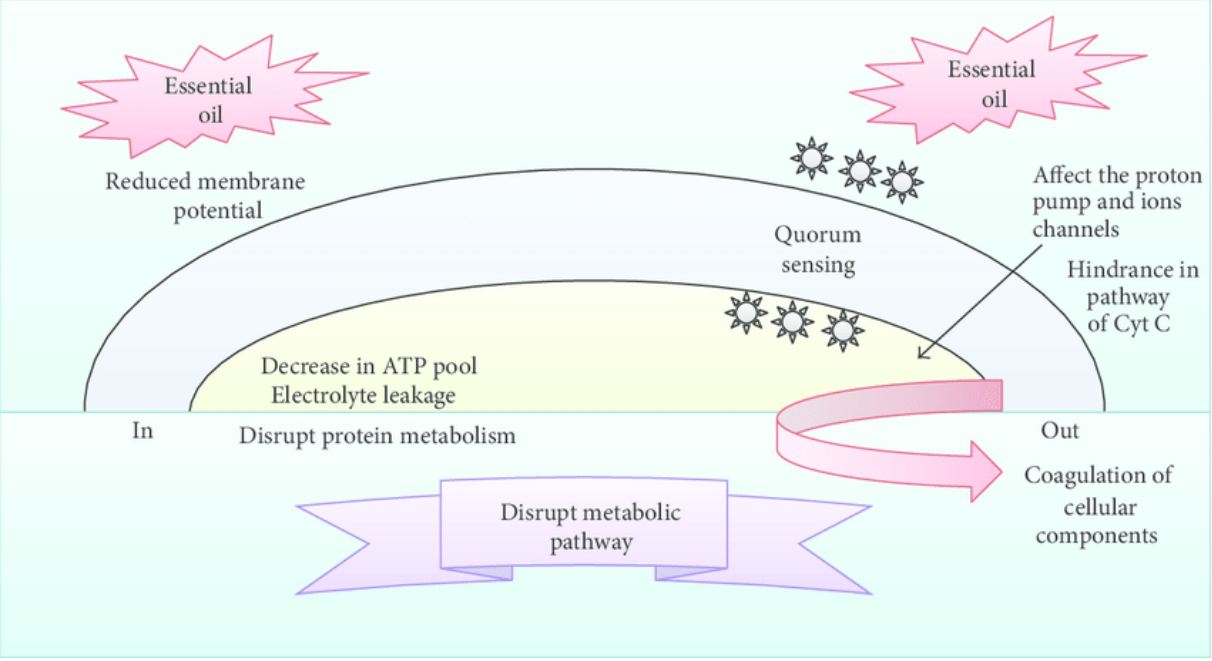
1.2. Eterična ulja

Eterična ulja su prozirne uljne, potpuno hlapljive i rijetko obojene tekućine izolirane iz aromatičnih biljaka. Imaju složen sastav te su uglavnom ugodnog mirisa. Biljke ih proizvode u svrhu obrane od patogenih mikroorganizama, insekata koji prenose bolesti i biljojeda. Mogu nastati u svim dijelovima biljke – korijenju, kori, stabljici, listovima, cvjetovima, plodovima. Dobivaju se postupcima hidrodestilacije, ekstrakcije organskim i nehlapljivim otapalima i tiještenjem, a ovisno o postupku razlikovat će se organoleptička i farmakološka svojstva pojedinog eteričnog ulja. Do danas je poznato oko 3000 različitih eteričnih ulja od kojih se oko njih 300 koriste u komercijalne svrhe (Kuštrak, 2005; Macwan i sur., 2016). Poznata su po brojnim antimikrobnim (antibakterijskim, antivirusnim, antifungalnim, antiparazitskim) i insekticidnim svojstvima. Danas se često koriste u aromaterapiji, farmaceutskoj (izolacija aktivnih tvari i proizvodnja farmaceutika), prehrambenoj (arome i očuvanje stabilnosti prehrambenih proizvoda) i industriji kozmetike (većinom u proizvodnji parfema) (Burt i sur., 2014).

Eterična ulja imaju 20-200 kemijski različitih sastavnica, a prevladavaju spojevi iz dvije skupine koje se razlikuju u svom biosintetskom putu: terpeni i terpenoidi te fenilpropanski derivati. Sastav eteričnog ulja uvelike može ovisiti o geografskoj lokaciji na kojoj je biljka rasla. Terpeni nastaju kondenzacijom izoprenskih jedinica, monoterpeni su građeni od dvije, seskviterpeni od tri, a diterpeni od četiri izoprenske jedince. Terpenoidi su terpeni koji sadrže kisik, a najpoznatiji terpenoidi su timol, karvakol, mentol, geraniol i brojni drugi. Funkcionalne skupine koje su najčešće u ovim spojevima su: alkani, alkeni, alkini, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, eteri, esteri i laktoni. Fenolne kiseline smatraju se odgovornima za antimikrobni učinak eteričnih ulja zbog svoje hidroksilne skupine. Glavne sastavnice ulja (2-3 najzastupljenije) prisutne su u velikim koncentracijama (20-70%), dok su sve ostale prisutne tek u tragovima. One ujedno određuju i glavna obilježja eteričnog ulja – miris, kemijska, fizikalna i biološka svojstva, od čega je najzanimljiviji antibakterijski učinak, a ostale sastavnice onda s njima mogu ulaziti u međusobne interakcije (aditivne, sinergističke ili antagonističke) što će u konačnici utjecati na krajnji učinak eteričnog ulja (Burt, 2004; Kuštrak, 2005; Macwan i sur., 2016).

1.2.1. Antibakterijski i antibiofilm učinak eteričnih ulja

Antibakterijska svojstva eteričnih ulja su ljudima poznata kroz povijest. Antibakterijska aktivnost pojedinog eteričnog ulja ovisi o kemijskom sastavu i koncentraciji pojedinih komponenti ulja. Zbog kompleksnosti kemijskog sastava eteričnih ulja nemoguće je antibakterijski učinak pripisati samo jednom kemijskom spoju nego je on posljedica djelovanja više sastavnica, kao i njihove kombinacije. Mehanizmi nisu detaljno istraženi, ali se pretpostavlja da većina eteričnih ulja nema jedan jedinstveni mehanizam antimikrobnog učinka već da je on posljedica nekoliko različitih meta na koje djeluju različite komponente ulja. Pojedini spojevi kojima je dokazan antimikrobni učinak, a često su glavne sastavnice ulja će drugačije djelovati ovisno o ostalim sastavnicama. Eterična ulja su hidrofobna što im omogućava uklapanje u stanične stijenke i stijenke mitohondrija što dovodi do promjene permeabilnosti tih membrana i posljedično povećane propusnosti i narušavanja funkcije stanice uslijed curenja staničnog sadržaja i gubitka makromolekula (Burt, 2004; Swamy i sur., 2016). Svi ovi procesi će u konačnici dovesti do lize stanice, koagulacije citoplazme, narušavanja proton motorne sile i toka elektrona te do smanjene sinteze ATP-a što je pogubno za stanicu (slika 5).



Slika 5. Mehanizmi i ciljna mjesta antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja (preuzeto iz Swamy i sur., 2016).

Novija istraživanja se dotiču i antibiofilm učinka pojedinih eteričnih ulja jer je biofilm važan faktor patogenosti nekih bakterijskih vrsta. Istraživanja su pokazala da neka eterična ulja

posjeduju antibiofilm učinak protiv bakterijskih vrsta *Listeria* spp. (Upadhyay i sur., 2013), *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* (Bazargani i Rohloff, 2016), *Salmonella typhimurium* (Miladi i sur., 2016), itd., ali unatoč brojnim istraživanjima sam mehanizam djelovanja na biofilm još nije u potpunosti jasan. Pretpostavljaju se neki od mogućih mehanizama kao što je uplitanje u bakterijsku međustaničnu komunikaciju što posljedično ima učinak na stvaranje biofilma (Burt i sur., 2014).

1.2.2. Eterično ulje vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch

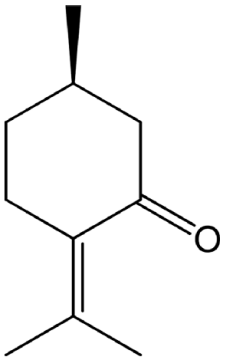
Micromeria thymifolia (Scop.) Fritsch ili točkasta bresina jedna je od 130 poznatih biljnih vrsta roda *Micromeria*, porodice Lamiaceae široko rasprostranjena na Balkanskom poluotoku (Srbija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina te Crna Gora) te na određenim područjima Italije i Mađarske. Obično raste u pukotinama stijena, duboko u kršu ili uz serpentine. Eterična ulja nekih vrsta roda *Micromeria* imaju značajan antioksidativni, antibakterijski i antifungalni učinak. Primijećeno je da eterično ulje vrste *Micromeria thymifolia* ima antimikrobni učinak na različite bakterijske vrste među kojima su i *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli* i *Candida albicans*. (Marin i sur., 2015; Bukvički i sur., 2016).

Eterično ulje vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch se sastoji od tridesetak sastavnica, a glavne sastavnice su monoterpenski ketoni poput pulegona, piperitenona i piperitenon oksida, a značajno su prisutni i limonen i trans-izopulegon. Antimikrobno djelovanje se većinski pripisuje pulegonu. Zamijećeno je i variranje u udjelu pojedinih komponenata ovisno o lokalitetu. Osim potvrđenog antimikrobnog učinka postoje i istraživanja koja potvrđuju postojanje učinka na bakterijsku međustaničnu komunikaciju koja je ključna u stvaranju biofilma (Šavikin i sur., 2010; Bukvički i sur., 2016).

1.2.3. Pulegon

Pulegon (5-metil-2-(1-metiletilidin)-cikloheksanon) je prirodni spoj koji spada u skupinu monoterpenskih ketona i prisutan je u eteričnim uljima brojnih biljnih vrsta iz rodova *Mentha, Micromeria, Calamintha* i drugih. Prvi puta je izoliran iz biljke *Mentha pulegium* L. od kuda potječe i ime. Glavna je sastavnica eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch s udjelom od 59,7%. Ima ugodan, osvježavajući miris, nešto između peperminta i kamfora.

Biosintetizira se iz terpinolena preko piperitenona, a prekursor je u biosintezi mentona, izomentona i izopulegona. Zbog zajedničkog biosintetskog puta često je u eteričnim uljima prisutan uz spomenute spojeve. Dokazano je da ima antimikrobni, antifungalni, antioksidativni i insekticidni učinak, a koristi se i za aromatiziranje zubnih pasta i vodica za usta, u aromaterapiji i kao sastojak parfema. Antimikrobni učinak pulegona pokazan je na nizu gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija rodova *Staphylococcus, Enterococcus, Bacillus, Escherichia, Klebsiella, Pseudomonas* i drugima, kao i značajan antifungalni učinak na određene *Candida* vrste. Na slici 6 prikazana je kemijska struktura pulegona. Strukturno se smatra da je dvostruka veza između C4 i C7 važna za antibakterijski učinak (Dhingra i sur., 2010; Oumzil i sur., 2002; Božović i Ragno, 2017).



Slika 6. Kemijska struktura pulegona

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pseudomonas aeruginosa je oportunistički patogen koji zbog mogućnosti prilagodbe različitim okolišnim uvijetima i brojnih mehanizama rezistencije predstavlja veliki izazov u pogledu antimikrobne terapije. Antibiotici koji se trenutno koriste u terapiji se često moraju primjenjivati u visokim dozama zbog formiranja biofilma. Povaćena koncentracije antibiotika znače i povećan rizik od razvoja neželjenih nuspojava (Moradali i sur., 2017). Budući da su multirezistentni sojevi, kao i razvoj biofilma učestali, jasno je da je potreban inovativan pristup terapiji infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*. Svjetska zdravstvena organizacija je navela ovu bakterijsku vrstu kao jednu od onih za koje je najpotrebniji razvoj novih antibiotika upravo zbog rezistencije. Eterična ulja predstavljaju potencijalno rješenje jer je njihov antimikrobni učinak dokazan brojnim studijama. Ta spoznaja je bila povod ovom istraživanju.

Svrha ovog rada je ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona pojedinačno i u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom na antimikrobnu osjetljivost i tvorbu biofilma kod bakterije *P. aeruginosa,* što bi moglo pridonijeti pronalasku nove i očuvanju postojeće terapije.

Specifični ciljevi ovog rada su sljedeći:

1) Odrediti minimalne inihibitorne koncentracije eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona za bakteriju *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 modificiranom metodom dvostruke serijske mikrodilucije;
2) Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na tvorbu filma bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853;
3) Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona u kombinaciji s tobramicinom na prethodno formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterije

U ovom istraživanju ispitivana je bakterijska vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, soj ATCC 27853.

3.1.2. Standardne kemikalije i otopine

- L-arginin (Merck)
- aldesol (Pliva)
- amonijev sulfat, $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma)
- dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma)
- glukoza (Fluka)
- kalijev hidroksid, KOH (Sigma)
- kalijev dihidrogen fosfat KH_2PO_4 (Sigma)
- kristal violet (Kemika)
- ledena octena kiselina, CH_3COOH (Kemika)
- magnezijev sulfat, $MgSO_4$ (Sigma)
- ultračista voda
- vodovodna voda
- željezov (II) sulfat heptahidrat, $FeSO_4 \times 7H_2O$

3.1.3. Eterično ulje i komponente

- eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch
- pulegon (Extrasynthese, Genay, France)

3.1.4. Antibiotici

- tobramicin (Sigma)

3.1.5. Filteri za sterilizaciju

- MS ® PTFE Syringe Filters, veličina pora 0,22 μm (Membrane Solution)

3.1.6. Hranjivi mediji

Korištena su 2 tekuća medija:

- LB (Luria-Bertani): 10g/L tripton, 5g/L kvaščev ekstrakt, 10 g/L NaCl; konačni pH=7,0 ± 0,2 (Liofilchem)
- M63 + 0,4% arginin: 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 13,6 g/L KH_2PO_4, 0,5 mg/L $FeSO_4 \times 7H_2O$, 0,2% glukoza, 1 mM $MgSO_4$, 0,4% arginin

3.2. Metode

3.2.1. Priprava otopina pulegona i eteričnog ulja mikromerije

- U ovom radu korišteni su komercijalno pribavljen pulegon i eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch dobiveno destilacijom vodenom parom korištenjem Clevenger aparature (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević, Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta). 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.

Radne otopine eteričnog ulja mikromerije i pulegona pripremljene su otapanjem u DMSO-u do koncentracije 100 mg/mL. Dalje su pripremljene radne otopine razrjeđivanje do potrebnih koncentracija kako je opisano u poglavljima 3.2.2., 3.2.3. i 3.2.4.

3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) eteričnog ulja mikromerije i pulegona za bakteriju *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 u M63 tekućem mediju s 0,4% arginina provedeno je modificiranom metodom mikrodilucije (Andrews, 2001). Za potrebe određivanja MIK-a korištene su koncentracije eteričnog ulja mikromerije i pulegona u rasponu od 0,5 mg/mL do 4 mg/mL. Mjerenje je provedeno za koncentracije 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL i 4 mg/mL. Otopine eteričnog ulja i pulegona koje su korištene u ovom ispitivanju pripremljene su dvostrukim serijskim razrijeđivanjem u 4 epruvete s hranjivim medijem M63 + 0,4% arginin. Noćna kultura je pripremljena inokulacijom 5 mL LB medija u epruveti malom količinom bakterijskog materijala. Epruveta je zatim inkubirana 24 h na 37°C u zračnoj tresilici na 200 rpm.

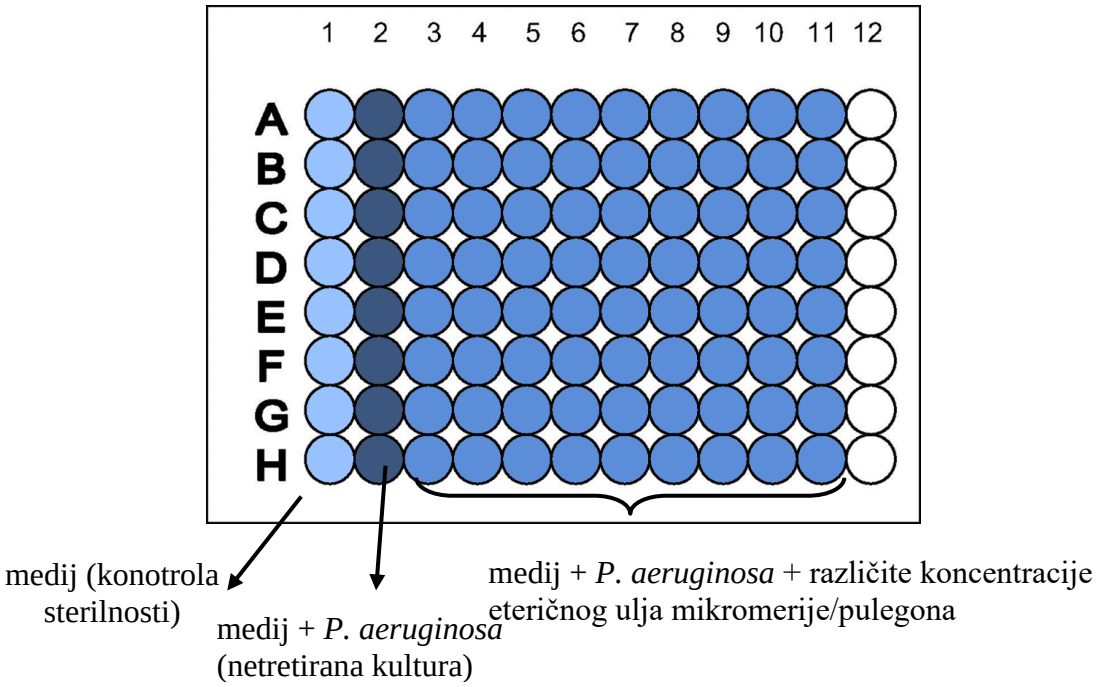
Kultura koju smo koristili za daljnja ispitivanja pripremljena je iz noćne kulture. Ispitivana kultura je imala 0,5 McFarland jedinica, odnosno kultura je sadržavala približno 10^8 CFU/mL. Željena koncentracije bakterijske kulture postignuta je razrjeđivanjem noćne kulture LB medijem, a mjerenjem optičke gustoće na 600 nm (UV/Vis Spektrofotometar UltroSpec 1000, Pharmacia). Tako pripremljena bakterijska kultura je zatim razrijeđena ranije pripremljenim serijskim razrijeđenjima eteričnog ulja mikromerije i pulegona u omjeru 1:100. Alikvot od 100 µL konačnih razrješenja bakterijske kulture i otopina eteričnog ulja i pulegona nanesen je na mikrotitarsku pločicu zaobljenog dna (Ratiolab GmbH). Mikrotitarska pločica je inkubirana preko noći na 37°C. Nakon inkubacije izmjerena je optička gustoća bakterijskih kultura čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer) na 570 nm. Na temelju spektrofotometrijskog mjerenja, ali i vizualno, određene su minimalne inhibitorne koncentracije za eterično ulje mikromerije i pulegon.

3.2.3. Ispitivanje učinka eteričnog ulja mikromerije i pulegona na stvaranje biofilma

Učinak eteričnog ulja mikromerije i pulegona na stvaranje biofilma *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 ispitivan je modificiranom metodom prema radu Vitanza i sur., 2018. Standardizirana bakterijska kultura, koja je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. razrijeđena do 0,5 McFarland jedinica, tretirana je s 11 otopina eteričnog ulja mikromerije i pulegona u rasponu koncentracija od 0,002 mg/mL do 2 mg/mL. Tih 11 koncentracija su: 0,002

mg/mL, 0,004 mg/mL, 0,008 mg/mL, 0,016 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,062 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL i 2 mg/mL i dobivene su razrjeđivanjem radnih otopina čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.1.

Bakterijska kultura je razrijeđena navedenim otopinama u omjeru 1:100 (100 µL kulture + 900 µL otopine eteričnog ulja mikromerije/pulegona različitih koncentracija, a zatim 100 µL dobivene otopine + 900 µL otopine eteričnog ulja mikromerije/pulegona različitih koncentracija). Alikvot od 100 µL konačno dobivene otopine bakterijske kulture i otopina različitih koncentracija eteričnog ulja/pulegona nanesen je na mikrotitarsku pločicu zaobljenog dna (Ratiolab GmBH) u osam ponavljanja. Pločica je inkubirana 24 h na 37°C nakon čega je provedeno mjerenje. Osim tretiranih bakterijskih kultura na pločicu je nanesena i netretirana kultura dobivena razrjeđivanjem noćne kulture postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2. Netretirana kultura služit će za kasniju usporedbu rezultata dobivenih tretiranjem bakterija. Također je u jedan stupac pločice nanesen čisti medij koji se smatra kontrolom sterilnosti. Slika 7 shematski prikazuje redoslijed nanošenja bakterijske kulture i kontrole na mikrotitarsku pločicu. Nakon 24-satne inkubacije, izmjerena je optička gustoća bakterijske kulture na 570 nm čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Dobivene vrijednosti su kasnije iskorištene za prikazivanje učinka eteričnog ulja mikromerije i pulegona na planktonske stanice.



Slika 7. Shematski prikaz redoslijeda nanošenja tretirane bakterijske kulture i kontrola na mikrotitarsku pločicu.

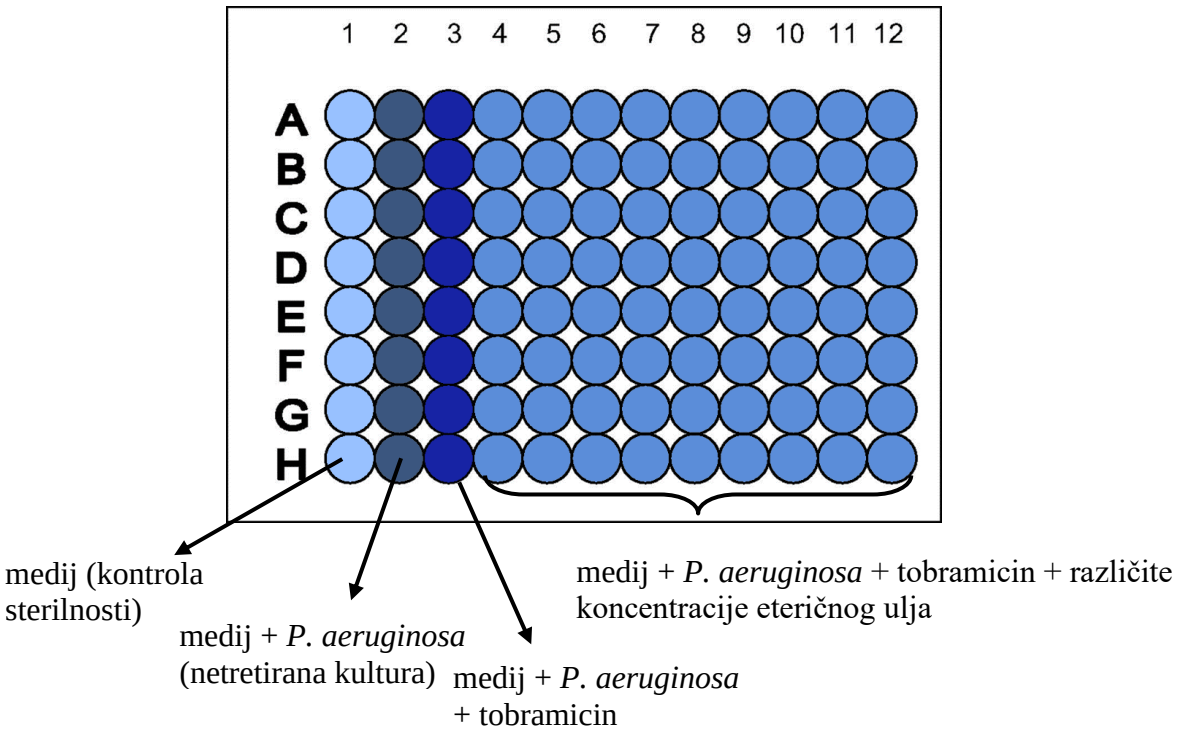
Bojenje i detekcija formiranog biofilma provedeno je prema ranije opisanoj metodi (Coffey i Anderson, 2014), uz nekoliko modifikacija. Sav višak medija s planktonskim stanicama je snažnim istresanjem uklonjen iz pločice. Istresanje je provedeno iznad posude sa staničevine natopljenom dezinficijensom (2% Aldesol). Pločica je dva puta isprana vodovodnom vodom, a sadržaj je također istresen u ranije spomenutu posudu sa staničevinom. Potom je u svaku jažicu dodano 125 µL 0,1% kristal violeta multikanalnom pipetom. Boja je inkubirana na sobnoj temperaturi 15 minuta nakon čega je višak boje uklonjen snažnim istresanjem pločice iznad posude sa staničevinom. Pločice su isprane vodovodnom vodom tri puta te su zatim ostavljene da se suše preko noći. Nakon sušenja je boja otopljena dodatkom 150 µL 30% ledene octene kiseline multikanalnom pipetom u svaku jažicu. Pločica je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je 125 µL sadržaja iz svake jažice prebačeno u novu mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom (Kartell). Miješanje sadržaja provedeno je pipetiranjem. Zatim je izmjerena apsorbancija na 540 nm čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer).

Učinak ispitivanih koncentracija eteričnog ulja i pulegona na formiranje biofilma prikazan je kao biofilm indeks (BI), koji pokazuje relativnu sposobnost stvaranja biofilma (Niu i Gilbert, 2004). Biofilm indeks se računa kao omjer optičke gustoće odbojenog biofilma na 540 nm i optičke gustoće bakterijske kulture na 570 nm (Savoia i Zucca, 2007).

3.2.4. Ispitivanje učinka eteričnog ulja mikromerije i pulegona s tobramicinom na formirani biofilm

Učinak eteričnog ulja mikromerije i timola u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom na formirani biofilm *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 ispitivan je modificiranom metodom opisanom u radu Kaushik i sur. Standardizirana bakterijska kultura je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. razrijeđena do 0,5 McFarland jedinica. Pripremljena bakterijska kultura nenesena je na 2 mikrotitarske pločice zaobljenog dna (Ratiolab GmbH) – jedna u svrhu ispitivanja učinka eteričnog ulja mikromerije u kombinaciji s tobramicinom, a druga za ispitivanje učinka pulegona u kombinaciji s tobramicinom na ranije formirani biofilm. U prvi stupac pločica naneseno je 100 µL samog medija u osam ponavljanja kao kontrola sterilnosti, a u ostatak jažica po 100 µL razrijeđene bakterijske kulture. Pločice su zatim inkubirane 24 h na 37°C. Nakon inkubacije sadržaj iz pločica je izvađen pipetom, a pločice su dva puta isprane s po 200 µL sterilnog hranjivog medija M63 + 0,4% arginin za svaku jažicu.

Pripremljeno je 12 otopina eteričnog ulja mikromerije i pulegona u kombinaciji s tobramicinom, pri čemu je koncentracija eteričnog ulja mikromerije i pulegona bila u rasponu od 0,002 do 4 mg/mL (0,002 mg/mL, 0,004 mg/mL, 0,008 mg/mL, 0,016 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,062 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL i 4 mg/mL), a koncentracija tobramicina u svakoj otopini 2 µg/mL. U prvi stupac gdje je kontrola sterilnosti i drugi stupac gdje je netretirana kultura dodano je po 150 µL sterilnog hranjivog medija M63 + 0,4% u osam ponavljanja. Otopina tobramicina koncentracije 2 µg/mL pripremljena je u većoj količini razrjeđivanjem s hranjivim medijem M63 + 0,4% arginin. Radne otopine eteričnog ulja mikromerije i pulegona su razrjeđivane do željenih koncentracija pripremljenom otopinom tobramicina (c=2 µg/mL). U treći stupac dodano je po 150 µL pripremljene otopine tobramicina u svaku jažicu. 150 µL pripremljenih otopina eteričnog ulja mikromerije i pulegona su u rastućoj koncentraciji nanesene na mikrotitarsku pločicu u kojoj je već formiran biofilm u osam ponavljanja u preostale stupce. Slika 8 shematski prikazuje redoslijed nanošenja tretiranih bakterijskih kultura i kontrola na mikrotitarsku pločicu na kojoj je ispitivan učinak eteričnog ulja mikromerije i pulegona u kombinaciji s tobramicinom na već formirani biofilm. Pločice su inkubirane 24 h na 37°C, a nakon inkubacije je izmjerena optička gustoća bakterijske kulture na 570 nm čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Podaci dobiveni ovim mjerenjem su kasnije prikazani kao učinak eteričnog ulja mikromerije/pulegona u kombinaciji s tobramicinom na planktonske stanice.



Slika 8. Shematski prikaz redoslijeda nanošenja tretiranih bakterijskih kultura i kontrola na mikrotitarsku pločicu na kojoj je ispitivan učinak eteričnog ulja mikromerije i pulegona u kombinaciji s tobramicinom na već formirani biofilm.

Postupak bojenja i detekcija formiranog filma proveden je kao što je opisano u poglavlju 3.2.3. Rezultati mjerenja optičke gustoće pri 540 nm predstavljaju količinu nastalog biofilma, a prikazani su kao relativna optička gustoća u odnosu na netretiranu kulturu.

3.2.5. Statistička analiza

Svako od navedenih ispitivanja provedeno je u tri neovisna pokusa. Konačni rezulati u pokusima gdje se ispitivao učinak isključivo eteričnog ulja i pulegona prikazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Rezultati ispitivanja učinka eteričnog ulja mikromerije i pulegona na planktonske stanice u kombinaciji s tobramicinom također su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Rezultati ispitivanja učinka eteričnog ulja mikromerije i pulegona na razvoj biofilma u kombinaciji s tobramicinom su prikazani kao postotak optičke gustoće u odnosu na netretiranu kulturu. Dobiveni rezultati analizirani su statističkim testom ANOVA, uz razinu statističke značajnosti $p<0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Minimalna inhibitorna koncentracija

Minimalne inihibitorne koncentracije eteričnog ulja mikromerije i pulegona za bakterijsku vrstu *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 u tekućem hranjivom mediju M63 + 0,4% arginin mediju prikazane su u tablici 1.

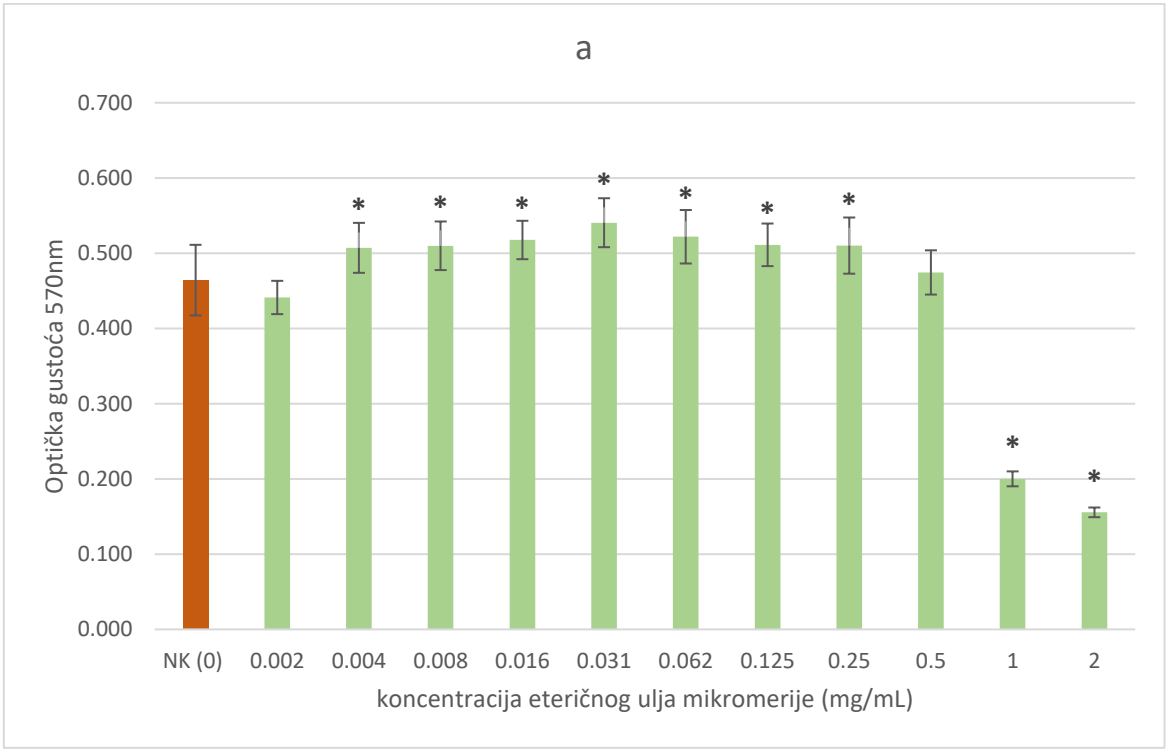
Tablica 1. Vrijednosti MIK za bakterijsku vrstu *P. aeruginosa* soja ATCC 27853

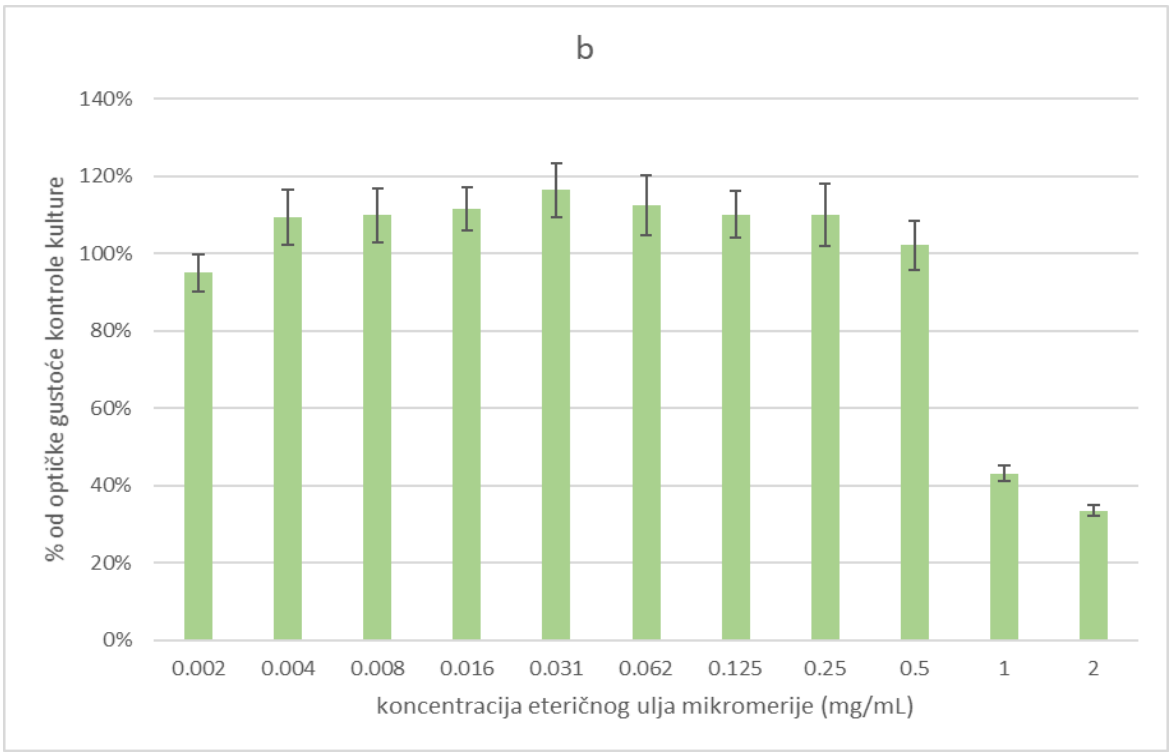
Uzorak	MIK (mg/mL)
Eterično ulje mikromerije	4
Pulegon	4

Metodom mikrodilucije utvrđeno je da MIK vrijednost eteričnog ulja mikromerije i pulegona za vrstu *P. aeruginosa* soj ATCC 27853 iznosi 4 mg/mL. Za potrebe ovog istraživanja kotrišteno je 11 subinhibitornih koncentracija, u rasponu od 0,002 do 2 mg/mL (0,002 mg/mL, 0,004 mg/mK, 0,008 mg/mL, 0,016 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,062 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL i 2 mg/mL), odnosno MIK/2048 do MIK/2 i inhibitorna koncentracija, odnosno sam MIK koji iznosi 4 mg/mL. U laboratoriju je prethodno određena minimalna inihibitorna koncentracija tobramicina koja iznosi 2 µL/mL i ta je koncentracija korištena i u ispitivanjima u ovom radu (Andričević, 2019).

4.2. Učinak eteričnog ulja mikromerije na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Slika 9 prikazuje učinak eteričnog ulja mikromerije u 11 subinhibitornih koncentracija na rast planktonskih stanica kulture bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853.





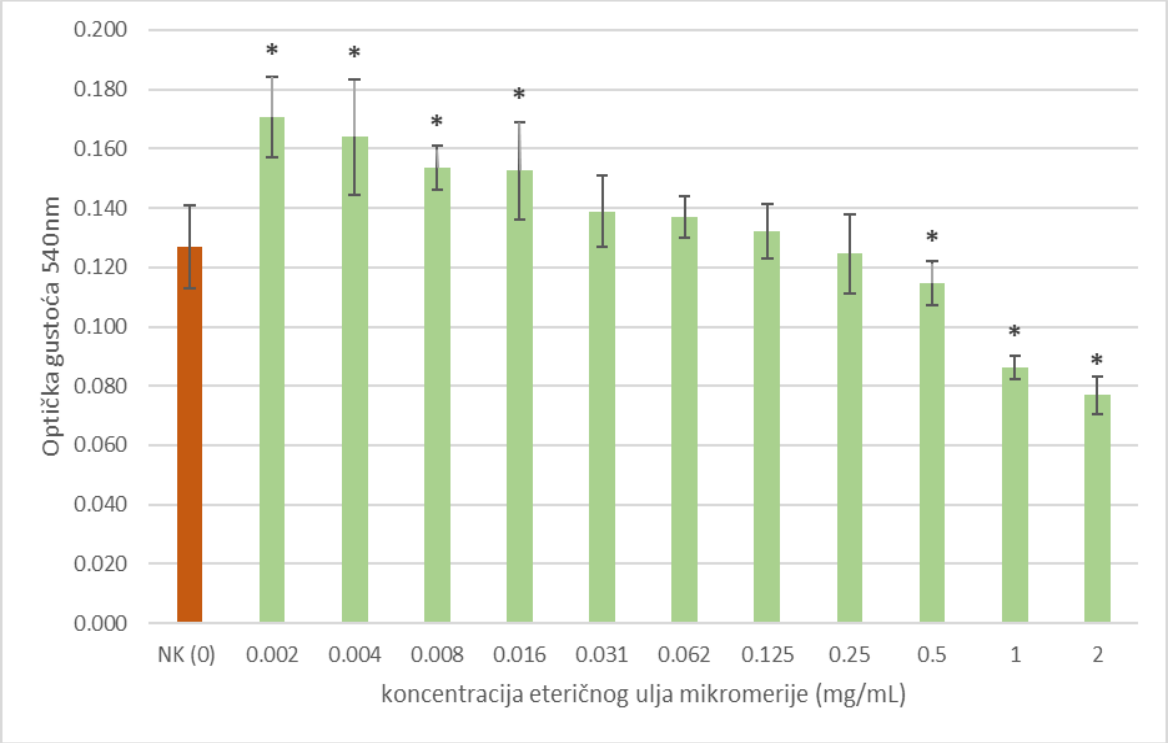
Slika 9. Učinak eteričnog ulja mikromerije na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine odabranih vrijednosti ± standardne devijacije; *p<0,05 u odnosu na netretiranu kulturu;

(a) Optička gustoća bakterijske kulture *P.aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovnisnosti o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije; NK – netretirana kultura;

(b) Relativna optička gustoća bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, tj. postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije.

Unutar ispitivanog raspona koncentracija primijećen je dvostruki učinak eteričnog ulja mikromerije – inihibitorni i promotivni - ovisno o koncentraciji. Najniža koncentracija (0,002 mg/mL) i dvije najviše (1 mg/mL i 2 mg/mL) su pokazale inhibitorni, dok su sve ostale (0,004-0,5 mg/mL) pokazale promotivni učinak. Većina koncentracija pokazala je statistički značajnu promjenu u odnosu na tretiranu kulturu, točnije sve koncentracije osim 0,002 mg/mL i 0,5 mg/mL. Inhibicija rasta planktonskih stanica zabilježena je od 5% ± 5% do 66% ± 1%. Promotorski učinak na rast planktonskih stanica bio je za 9% ± 7% do 16% ± 7%, ovisno o koncentraciji.

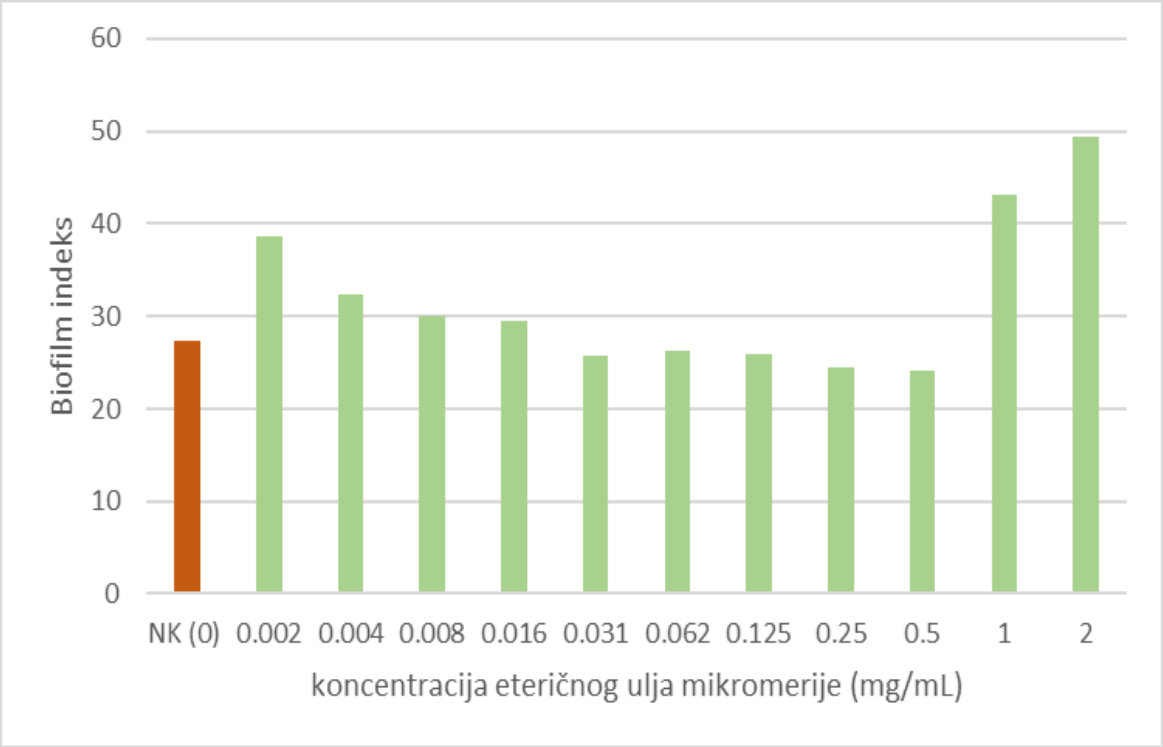
Količina nastalog biofilma u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije prikazana je na slici 10.



Slika 10. Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, prikazana kao aritmetička sredina ± standardna devijacija apsorbancije pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije, NK – netretirana kultura; *p<0,05 u odnosu na NK.

Pri koncentracijama od 0,002 mg/mL do 0,125 mg/mL zabilježena je veća količina nastalog biofilma u odnosu na netretiranu kulturu. Statistički značajan porast promijećen je za koncentracije 0,002-0,016 mg/mL. Pri koncentracijama od 0,25 mg/mL do 2 mg/mL količina nastalog biofilma bila je manja u odnosu na netretiranu kulturu, a smanjenje količine nastalog biofilma je bilo statistički značajno za sve navedene koncentracije osim za koncentraciju 0,025 mg/mL.

Ovisnost biofilm indeksa o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije prikazan je slikom 11.

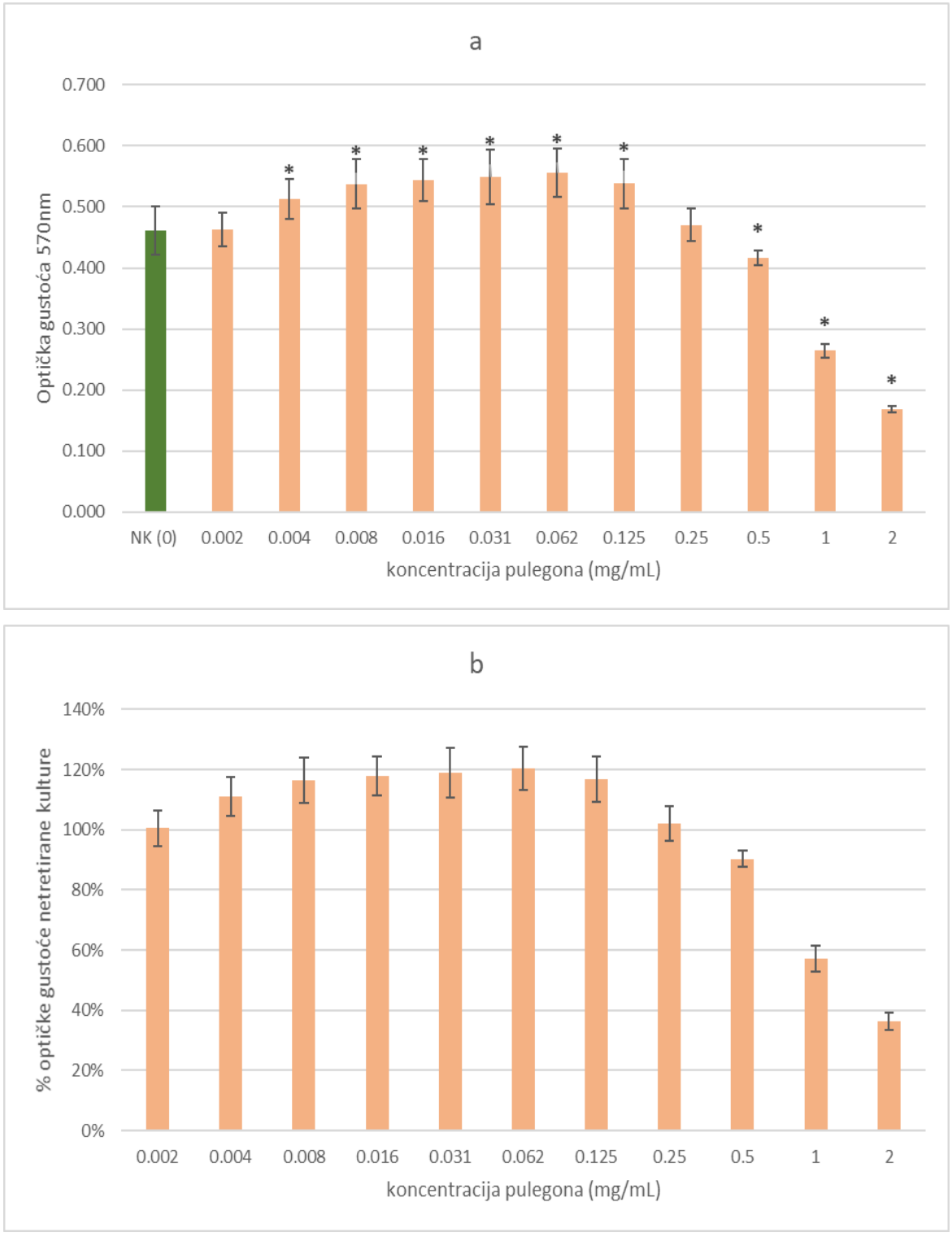


Slika 11. Biofilm indeks bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije. Vrijednosti su prikazane kao omjer aritmetičkih sredina apsorbancija pri 540 nm i 570 nm za svaku pojedinu koncentraciju eteričnog ulja; NK – netretirana kultura.

Biofilm indeks za koncentracije 0,002-0,008 mg/mL, 1 mg/mL i 2 mg/mL je veći nego za netretiranu kulturu, što upućuje na to da pri tim koncentracijama eterično ulje mikromerije potiče stvaranje biofilma. Najznačajniji porast u biofilm indeksu je zabilježen za najnižu i dvije najveće koncentracije. Porast biofilm indeksa u odnosu na netretiranu kulturu za koncentraciju od 0,002 mg/mL iznosi 41,2%, za koncentraciju od 1 mg/mL 57,4% i za koncentraciju od 2 mg/mL 80,6%.

4.3. Učinak pulegona na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Slika 12 prikazuje učinak pulegona u 11 odabranih subinhibitornih koncentracija na planktonske stanice.



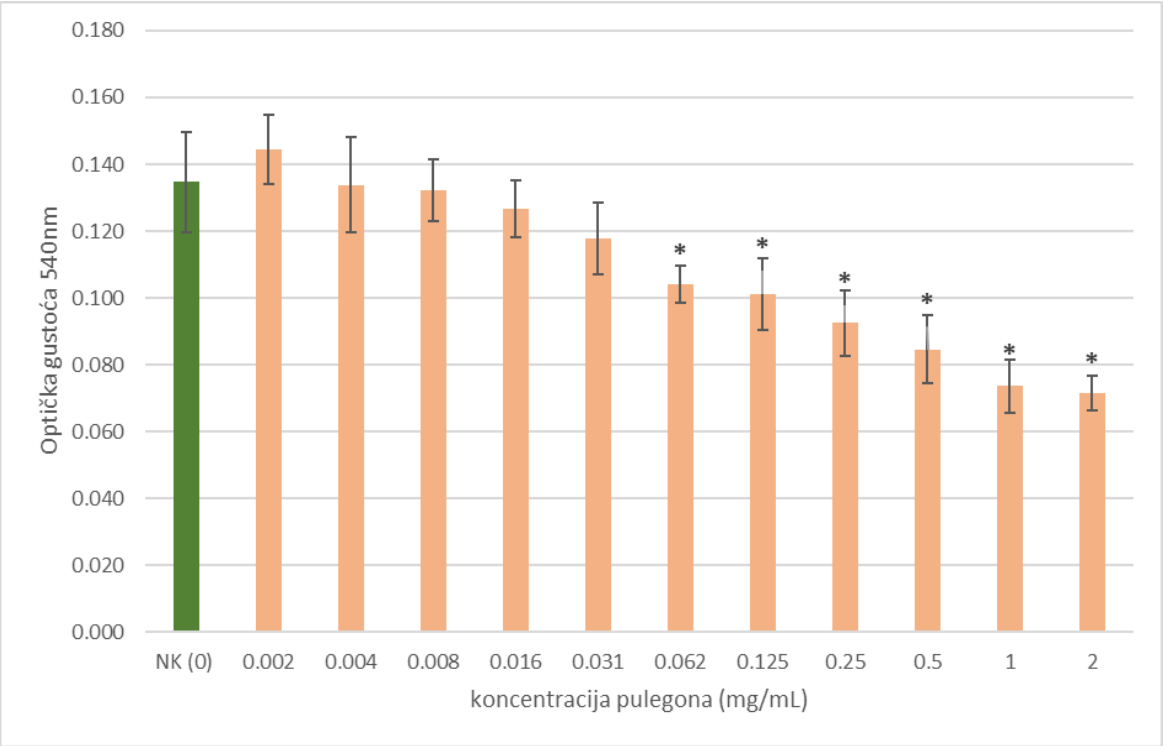
Slika 12. Učinak pulegona na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine ± standardne devijacije, *p<0,05 u odnosu na netretiranu kulturu (NK);

(a) Optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji pulegona; NK – netretirana kultura;

(b) Relativna optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853, odnosno postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji pulegona.

Pri većini koncentracija primijećen je statistički značajna razlika u rastu bakterijske kulture tretirane pulegonom u odnosu na netretiranu kulturu, točnije za sve promatrane koncentracije osim 0,002 mg/mL i 0,25 mg/mL. Ovisno o koncentraciji pulegona uočen je inhibitorni i promotivni učinak na rast planktonskih stanica. Pri većim koncentracijama pulegona (0,5-2 mg/mL) primijećen je značajan inhibitorni učinak koji je rastao s povećanjem koncentracije pulegona. Pri koncentraciji 0,5 mg/mL rast planktonskih stanica je reduciran za 10% ± 3%, dok je pri najvećoj promatranoj koncentraciji od 2 mg/mL reduciran za 64% ± 1%. Pri nižim koncentracijama (0,004-0,125 mg/mL) primijećen je promotivni učinak na rast planktonskih stanica, ovisno o koncentraciji registriran je porast za 11% ± 7% do 20% ± 9%.

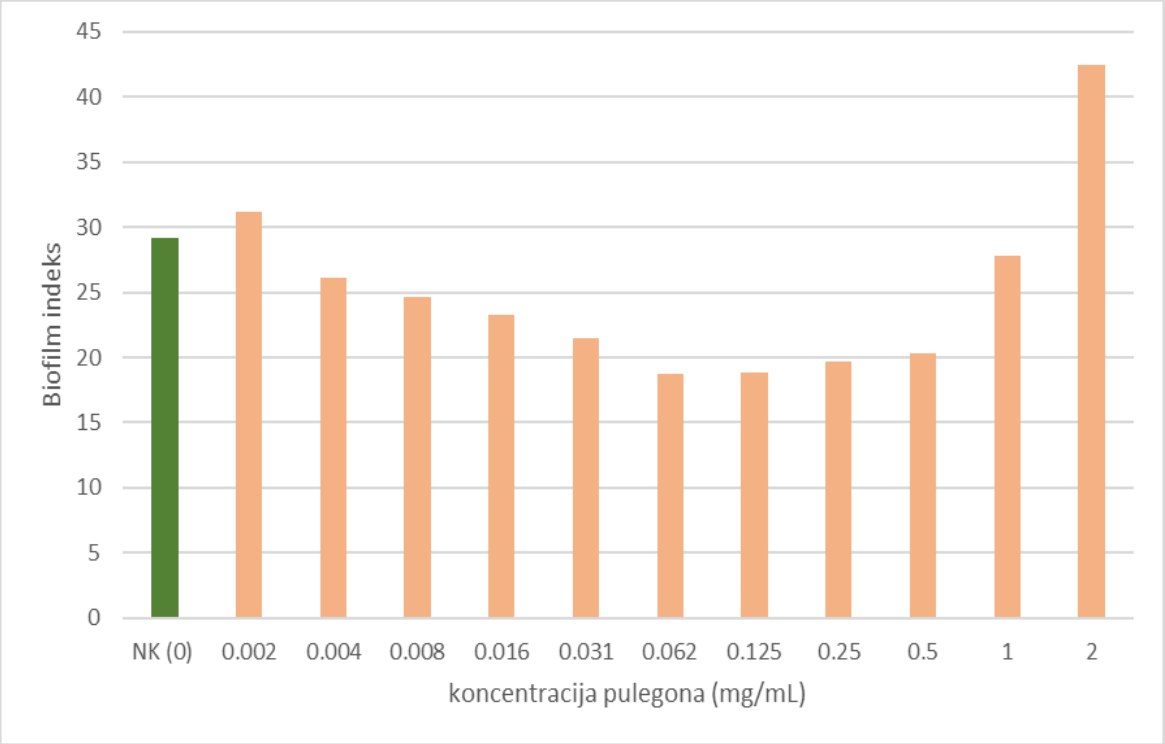
Količina nastalog biofilma u ovisnosti o koncentraciji pulegona prikazana je slikom 13.



Slika 13. Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, prikazane su aritmetičke sredine ± standardne devijacije apsorbancije pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji pulegona, NK – netretirana kultura; *p<0,05 u odnosu na NK.

Statistički značajne razlike u količini proizvedenog biofilma u kulturama tretiranim pulegonom, u odnosu na netretiranu kulutru, utvrđene su pri višim koncentracijama (0,062-2 mg/mL). Pri svim značajnim koncentracijama izmjerena je manja količina proizvedenog biofilma u odnosu na netretiranu kulturu. Količina prizvedenog biofilma je opadala s porastom koncentracije, odnosno pri koncentraciji od 2 mg/mL zabilježeno je najveće smanjenje proizvodnje. Jedino pri koncentraciji 0,002 mg/mL došlo je do povećanja proizvodnje biofilma, ali taj učinak nije bio statistički značajan.

Ovisnost biofilm indeksa o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije prikazan je slikom 14.

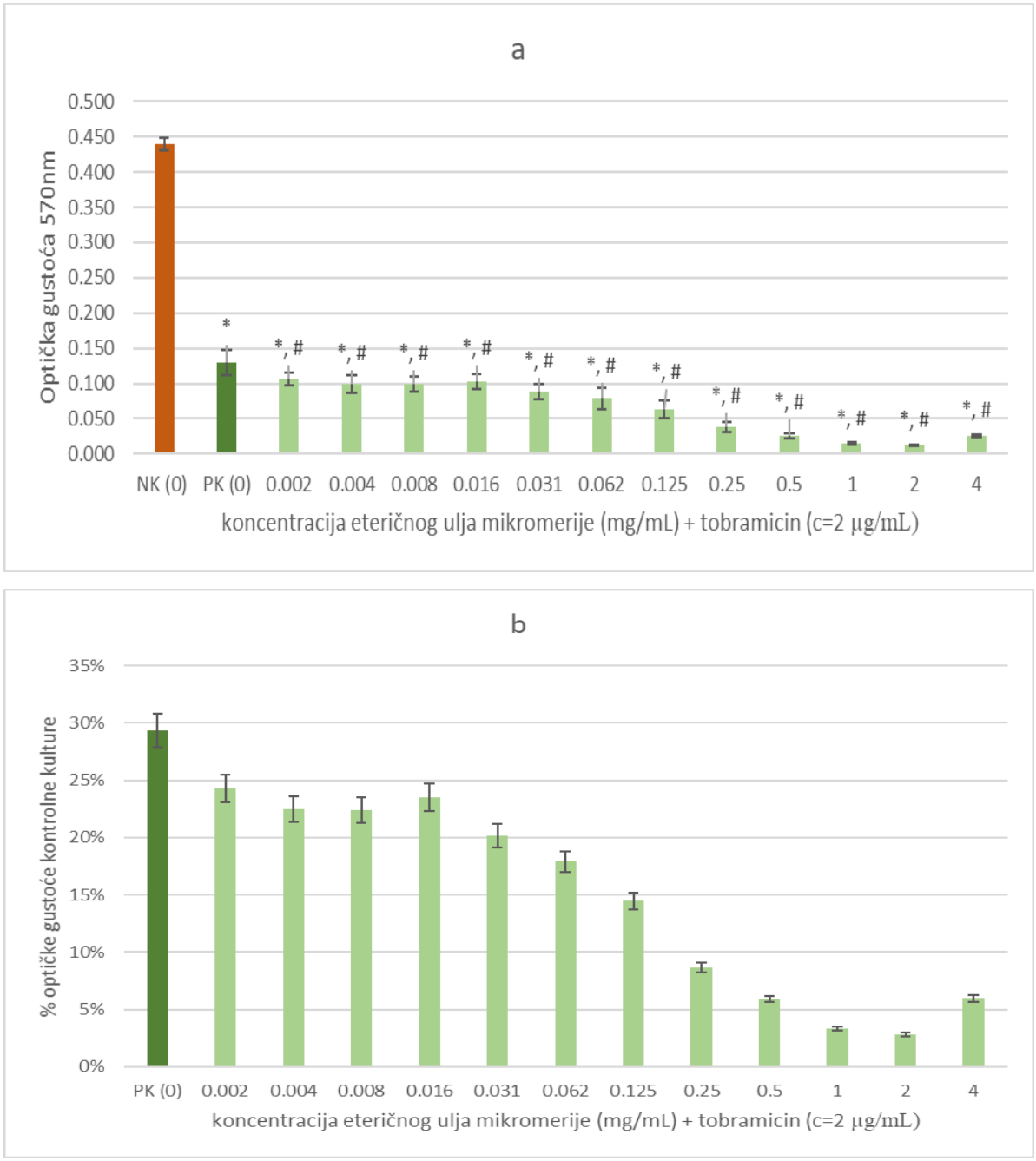


Slika 14. Biofilm indeks bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 u ovisnosti o koncentraciji pulegona. Vrijednosti su prikazane kao omjer aritmetičkih sredina apsorbancija pri 540 nm i 570 nm za svaku pojedinu koncentraciju pulegona; NK – netretirana kultura.

Biofilm indeks je za koncentracije 0,002 mg/mL i 2 mg/mL bio veći nego za netretiranu kulturu, dok je za sve ostale promatrane koncentracije bio manji nego za netretiranu kulturu. Porast biofilm indeksa u odnosu na netretiranu kulturu je za koncentraciju 0,002 mg/mL bio 6,8%, a za koncentraciju 2 mg/mL 45,5%.

4.4. Učinak eteričnog ulja mikromerije i tobramicina na formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa*

Slika 15 prikazuje učinak eteričnog ulja mikromerije u 11 odabranih subinhibitornih koncentracija i inibitornu koncentraciju u kombinaciji s tobramicinom koncentracije 2 µg/L na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, nakon što je biofilm već formiran.



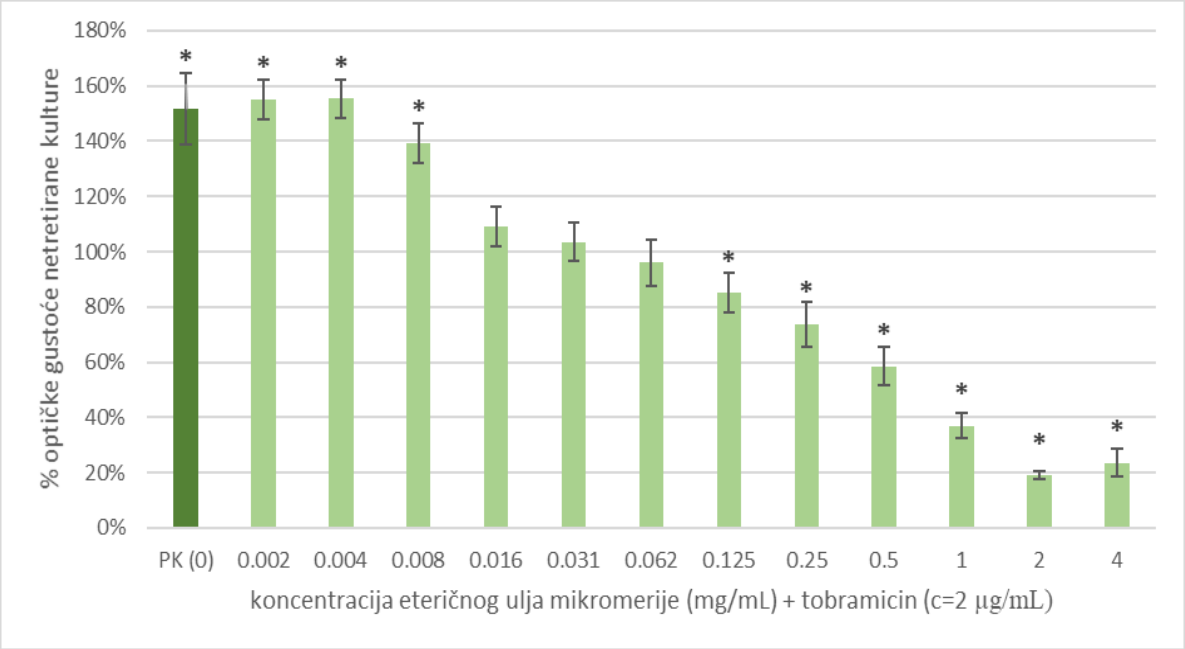
Slika 15. Učinak eteričnog ulja mikromerije u kombinaciji s tobramicinom na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine ± standardne devijacije; * $p<0,05$ u odnosu na netretiranu kulturu, # $p<0,05$ u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom;

(a) Optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije, NK – netretirana kultura, PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom);

(b) Relativna optička gustoća bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, odnosno postotak od optičke gustoće netretirane kulture (NK) u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije, PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom).

Pomoću ANOVA testa utvrđena je statistički značajna razlika između rasta netretirane kulture bakterija i rasta bakterija koje su tretirane samo tobramicinom ili kombinacijom tobramicina i eteričnog ulja mikromerije različitih koncentracija. Sve ispitivane koncentracije su pokazale značajno smanjenje rasta bakterija u odnosu na netretiranu kulturu. Također je utvrđena i statistički značajna razlika u bakterijskom rastu između bakterija tretiranih samo tobramicinom i onih tretiranih kombinacijom tobramicina i eteričnog ulja mikromerije pri svim promatranim koncentracijama. Sam tobramicin (c=2 µg/mL) reducira rast planktonskih stanica za 71% ± 4%. Eterično ulje mikromerije u svim ispitivanim koncentracijama (0,002-4 mg/mL) u kombinaciji s tobramciniom (c=2 µg/mL) reducira rast planktonskih stanica, a jačina inhibicije ovisi o koncentraciji. Sve ispitivane koncentracije djeluju sinergistički s tobramicinom i jačina učinka raste s porastom koncentracije. Iznimka je koncentracija eteričnog ulja od 4 mg/mL koja pokazuje nešto slabiji inhibitorni učinak nego neke niže koncentracije. Rast planktonskih stanica reduciran je za 71% ± 4% do 97% ± 0%. Najjači učinak primijećen je za koncentracije 1 mg/mL (97% ± 0%) i 2 mg/mL (97% ± 0%).

Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 tretiranog kombinacijom eteričnog ulja mikromerije i tobramicina (c=2 µg/mL) nakon 24 sata prikazana je slikom 16.

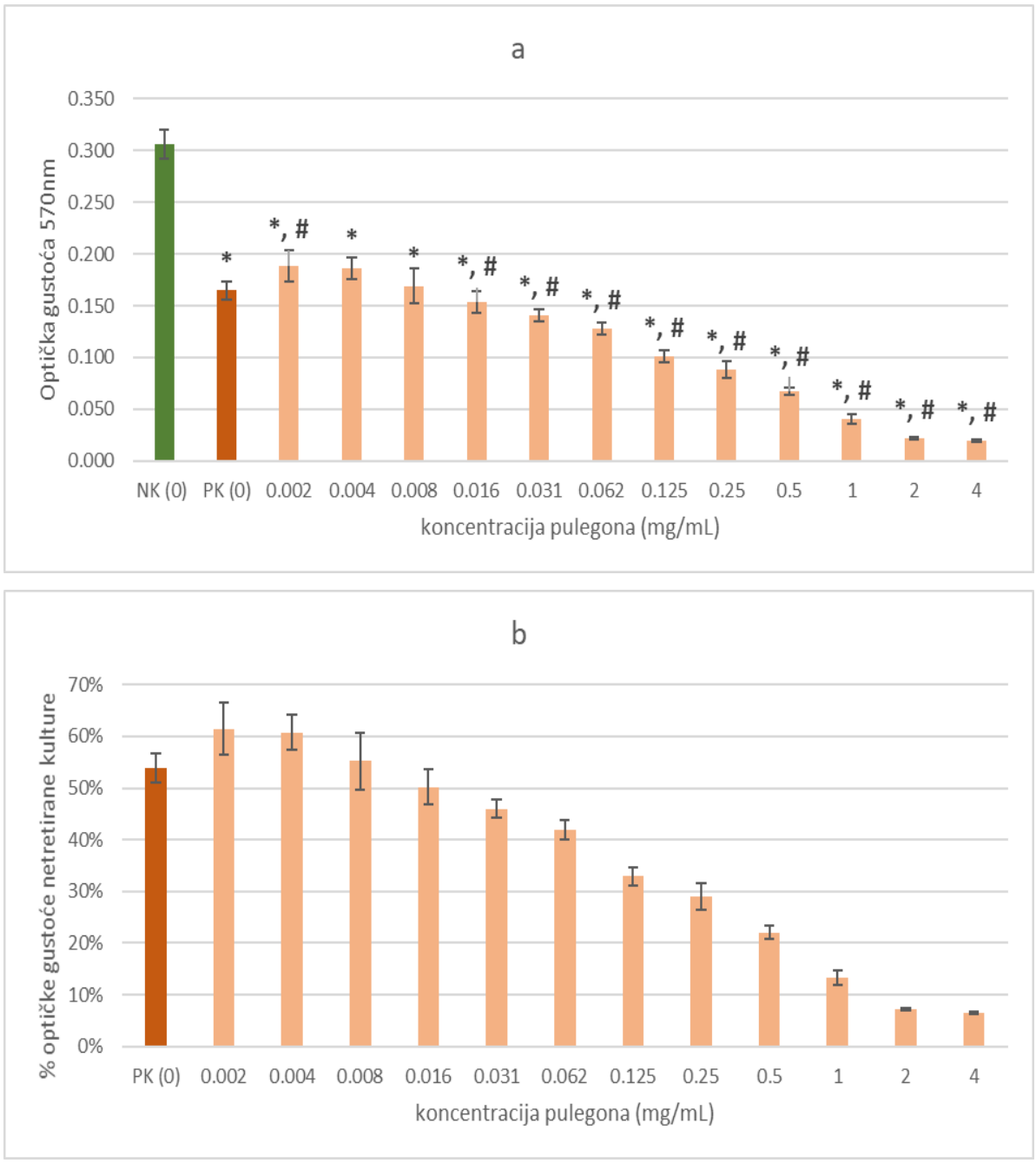


Slika 16. Količina biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 nastalog nakon tretiranja kombinacijom eteričnog ulja mikromerije i tobramicina, prikazana kao postotak od optičke gustoće netretirane kulture ± standardna devijacija izražena u postotku pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja mikromerije; NK – netretirana kultura; PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom); *p<0,05 u odnosu na netretiranu kulturu.

Statistički značajna razlika u količini formiranog biofilma izmjerena je za pozitivnu kontrolu te koncentracije 0,002-0,008 mg/mL i 0,125-4 mg/mL. Pozitivna kontrola, odnosno bakterije tretirane samo tobramicinom, pokazala je povećanje količine formiranog biofilma u odnosu na netretiranu kulturu od 52% ± 13%. Koncentracije od 0,002 mg/mL do 0,008 također su pokazale porast u količini formiranog biofilma sličnog intenziteta kao i sam tobramicin. Veće koncentracije (0,125-4 mg/mL) su pokazale smanjenje količine nastalog biofilma u rasponu od 15% ± 7% do 81% ± 1%, ovisno o koncentraciji. Učinak je bio jači što je koncentracija eteričnog ulja mikromerije bila veće, s iznimkom za koncentraciju 4 mg/mL pri kojoj je zabilježen manji porast u odnosu na koncentraciju od 2 mg/mL.

4.5. Učinak pulegona i tobramicina na formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa*

Slika 17 prikazuje učinak pulegona u 11 subinhibitonih koncentracija i inhibitornoj koncentraciji u kombinaciji s tobramicinom u koncentraciji od 2 µg/mL na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, nakon što je biofilm već formiran.



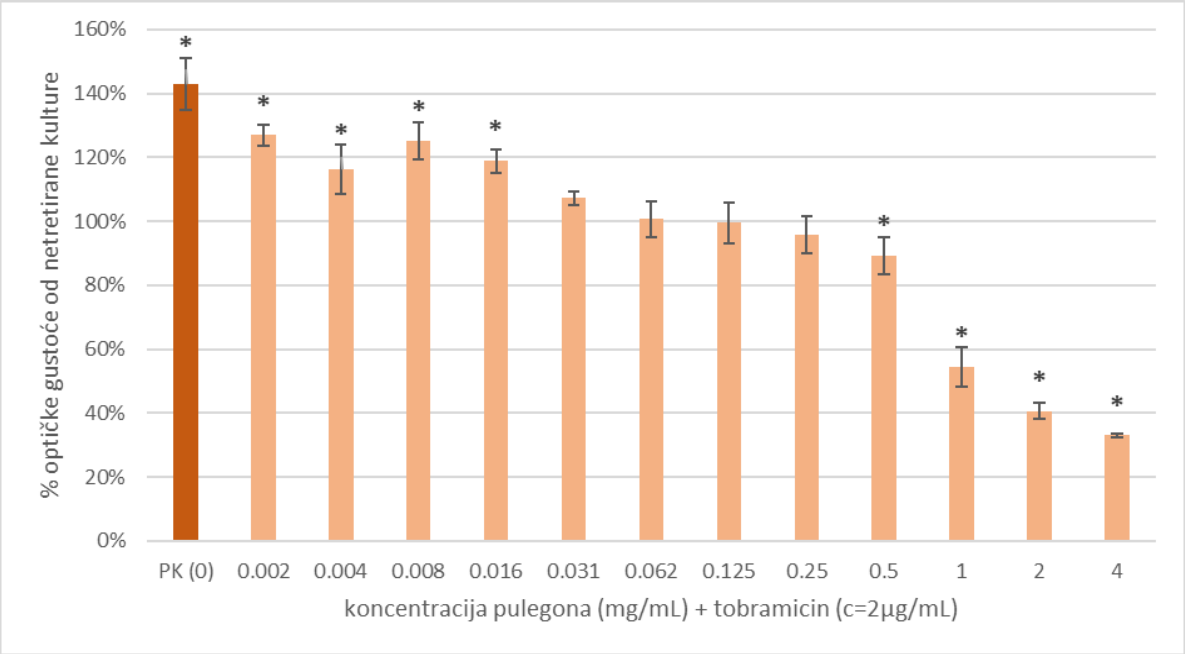
Slika 17. Učinak pulegona i tobramicina na rast planktonskih stanica bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine ± standardne devijacije; *p<0,05 u odnosu na netretiranu kulturu; #p<0,05 u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom;

(a) Optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji pulegona; NK – netretirana kultura; PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom);

(b) Relativna optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853, odnosno postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji pulegona; PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom).

ANOVA testom je utvrđena statistički značajna razlika u rastu planktonskih stanica tretiranih tobramicinom i kombinacijom tobramicina i različitih koncentracija pulegona u odnosu na netretiranu kulturu za sve promatrane koncentracije pulegona. Statistički značajna razlika u rastu planktonskih stanica tretiranih kombinacijom tobramicina i pulegona u odnosu na one tretirane samo tobramicinom utvrđena je za koncentracije 0,002 mg/mL i 0,016-4 mg/mL. Kombinacija tobramicina i pulegona u svim ispitivanim koncentracijama ima inhibitorni učinak na rast planktonskih stanica, ali pri nižim koncentracijama (0,002-0,008 mg/mL) pulegon ima antagonistički učinak, odnosno smanjuje učinak samog tobramicina. Pri svim ostalim koncentracijama ima aditivni učinak, odnosno pojačava učinak tobramicina. Ovisno o koncentraciji pulegona došlo je do inhibicije rasta od 39% ± 5% do 94% ± 0%. Što je koncentracija pulegona veća, to je jači inhibicijski učinak na rast planktonskih stanica.

Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 nakon tretmana kombinacijom pulegona i tobramicina (c=2 µg/mL) prikazana je slikom 18.



Slika 18. Količina biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 nastalog nakon tretiranja kombinacijom pulegona i tobramicina, prikazana kao postotak optičke gustoće netretirane kulture ± standardna devijacija izražena u postotku pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji pulegona; NK – netretirana kultura; PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom); *p<0,05 u odnosu na netretiranu kulturu.

Statistički značajne razlike u količini formiranog biofilma nastalog nakon tretiranja s tobramicinom i kombinacijom pulegona i tobramicina u odnosu na netretiranu kulturu su zabilježene za sam tobramicin i kombinacije s pulegonom u koncentracijama 0,002-0,016 mg/mL i 0,5-4 mg/mL. Uočen je dvojaki učinak na količinu formiranog biofilma, sam tobramicin i kombinacije tobramicina s nižim koncentracijama pulegona (0,002-0,016 mg/mL) dovele su do povećanja proizvodnje biofilma, dok su kombinacije tobramicina s višim koncentracijama pulegona (0,5-4 mg/mL) dovele do smanjenja proizvodnje biofilma. Sve koncentracije pulegona su imale antagonistički učinak s tobramicinom, odnosno tobramicin je doveo do najvećeg porasta u količini formiranog biofilma. Zabilježeni porast nakon tretiranja samo s tobramicinom iznosio je 43% ± 8%. Kombinacije kod kojih je i zabilježen porast u odnosu na netretiranu kulturu imale su slabiji učinak od samog tobramicina.

5. RASPRAVA

Pseudomonas aeruginosa je oportunistički patogen koji ozbiljne infekcije uzrokuje uglavnom kod ljudi s oslabljenim imunosnim sustavom (kao što su oboljeli od cistične fibroze ili AIDS-a), hospitaliziranih pacijenata i osoba s oštećenom fiziološkom barijerom (primjerice rane, opekline i kirurški zahvati) (Kalenić i sur., 2013). Ovaj je patogen razvio brojne mehanizme rezistencije na antibiotike, ali možda najznačajniji je razvoj biofilma. Biofilm se sastoji od bakterijskih stanica vezanih na površinu pomoću egzopolisaharida koje su same proizvele i na taj način se zaštitile od vanjskih utjecaja (Mah i O'Toole, 2001). Uzevši u obzir da je ova ubikvitarna bakterija izuzetno prisutna u bolničkoj sredini i sklona razvoju rezistentnih, a ponekad čak i multirezistentnih, sojeva, *Pseudomonas aeruginosa* je velik izazov za razvoj učinkovite antimikrobne terapije. Povećanje doze antibiotika povećava i rizik od štetnih učinaka samog lijeka, zbog toga se danas sve više pokušavaju pronaći zamjene za klasičnu terapiju.

Eterična ulja, koja su stoljećima poznata kao antimikrobna sredstva, možda mogu ponuditi riješenje. Sva eterična ulja imaju 1-3 glavne sastavnice koje čine čak do 70% sastava i kojima se uglavnom pripisuje antibakterijski učinak. Ostale su sastavnice prisutne tek u tragovima, ali mogu značajno utjecati na antibakterijski učinka (sinergistički ili antagonistički). Mehanizmi još uvijek nisu detaljno istraženi, ali se pretpostavlja da eterična ulja djeluju na propusnost membrane samih bakterija i na taj način narušavaju njezinu funkciju, te dovode do lize stanice (Burt, 2004). Danas su posebno zanimljiva istraživanja usmjerena na antibiofilm učinak eteričnih ulja jer upravo biofilm otežava liječenje pacijenata inficiranih bakterrijom *Pseudomonas aeruginosa.* Neka od eteričnih ulja vrsta roda *Micromeria* pokazale su antimikrobni učinak na razne bakterijske vrste, među kojima su i *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Salmonella* sp. i *Escherichia coli,* ali i antifungalni učinak na vrstu *Candida albicans* (Marin i sur., 2015; Bukvički i sur., 2016). Glavna sastavnica eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* je pulegon, s udjelom od 59,7% (Vladimir-Knežević, neobjavljeni rezultati) i njemu se pripisuju antimikrobna svojstva spomenutog eteričnog ulja. Pokazan je učinak pulegona na međustaničnu komunikaciju (*quorum sensing*) koji je ključan za proizvodnju biofilma (Šavikin i sur., 2010; Bukvički i sur., 2016). Dvostruka veza između C4 i C7 se smatra ključnom za antibakterijski učinak pulegona. Još uvijek ne postoji značajan broj istraživanja na temu antibakterijskog i antibiofilm učinka pulegona koji bi ponudili detaljniji uvid u mehanizme i raspone djelovanja. Ovo istraživanje je provedeno u

svrhu otkrivanja potencijalno korisnog učinka eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifiolia* i njegove najzastupljenije aktivne sastavnice pulegona na rast bakterija *Pseudomonas aeruginosa* i njegovu sposobnost razvoja biofilma.

U prvom dijelu ovog rada ispitivan je učinak eteričnog ulja biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853. Istovremeno je provedena i analiza učinka spomenutih tvari na rast planktonskih stanica. Učinak na planktonske stanice praćen je mjerenjem optičke gustoće bakterijske kulture pri 570 nm, nakon 24-satne inkubacije s otopinama eteričnog ulja mikromerije i pulegona u različitim koncentracijama. Količina nastalog biofilma mjerena je kao apsorbancija pri 540 nm nakon bojenja kristal violetom i odbojavanja octenom kiselinom. Konačni učinak na biofilm je prikazan kao biofilm indeks. Razlog zašto je biofilm indeks prikazan je taj što pomoću njega dobivamo informaciju o rastu kulture i količini nastalog biofilma istovremeno. On predstavlja omjer apsorbancija na 540 nm i 570 nm, odnosno prikazuje relativnu sposobnost bakterija da stvaraju biofilm. Zbog toga je biofilm indeks koristan parametar za daljnja istraživanja u ovom području (Niu i Gilbert, 2004). Jedna od zanimljivijih pojava koja se može vidjeti u ovom radu je ta da eterično ulje mikromerije ima dvojaki učinak na rast planktonskih stanica – promotivni i inhibitorni. Štoviše, većina promatranih koncentracija (0,004-0,5 mg/mL) su pokazale promotivni učinak na rast planktonskih stanica. Niže koncentracije (0,002-0,125 mg/mL) su također pokazale i promotivni učinak na razvoj biofilma, dok su više koncentracije ipak imale inhibitorni učinak na biofilm. Vrlo sličan trend ponašanja je pokazao i pulegon kao aktivna tvar eteričnog ulja mikromerije. Većina promatranih koncentracija (0,002-0,25 mg/mL) je imala promotivni učinak na rast planktonskih stanica, dok su više koncentracije (0,5-2 mg/mL) ipak pokazale inhibitorni učinak na rast planktonskih stanica. Učinak pulegona na biofilm je imao sličan trend kao i eterično ulje, ali je učinak čistog pulegona bio nešto jači, odnosno sve koncentracije osim najniže (0,002 mg/mL) su djelovale inhibitorno na proizvodnju biofilma, a učinak je bio jači što je koncentracija pulegona bila veća. S obzirom da je pulegon jedna od najzastupljenijih sastavnica u eteričnom ulju vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i smatra se odgovornim za antibiotički učinak, ovakvi su rezultati bili i očekivani. Razlika u jačini učinka može se objasniti činjenicom da eterično ulje vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch sadrži brojne druge komponente uz pulegon koje mogu ulaziti u složene međusobne interakcije i na taj način modificirati njegov učinak (Burt, 2004; Swamy i sur., 2016). Niu i Gilbert su u svom radu prikazali sličan učinak citronelola na bakterijsku vrstu *Pseudomonas aeruginosa* – pri nižim koncentracijama je proizvodnja biofilma bila podjednaka ili blago veća

nego kod netretiranih bakterija, a povećanjem koncentracije došlo je do smanjenja proizvodnje biofilma. Usporedimo li citronelol i pulegon možemo uočiti strukturnu sličnost, odnosno dvostruka veza koja se smatra važnom za antibakterijski učinak pulegona prisutna je i u strukturi citronelola.

U drugom dijelu ovog rada ispitivan je učinak eteričnog ulja biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom na već prethodno formirani biofilm bakterije *Pseudomonas aeruginosa* soja ATCC 27853. Tobramicin je korišten u koncentraciji od 2 µg/mL, što je njegova minimalna inhibitorna koncentracija. Aminoglikozidni antibiotici se koriste u terapiji ozbiljnih infekcija *P. aeruginosa* uglavnom u kombiniranoj terapiji. Tobramicin je aminoglikozidni antibiotik koji se inhalacijski koristi u terapiji cistične fibroze. Značajni neželjeni učinci tobramicina su ototoksičnost i neurotoksičnost. Ove su nuspojave izraženije ukoliko je primijenjena visoka doza kroz duži period (Prayle sur., 2010). Zbog toga se danas pokušavaju pronaći načini smanjivanja doze i trajanja terapije tobramicinom. Nekoliko je studija već ispitivalo učinak različitih tvari u kombinaciji s tobramicinom s ciljem pronalaska tvari koje bi pokazale sinergistički učinak u eradikaciji biofilma *P. aeruginosa*. Kombinacije tobramicina i SDS-a, te tobramicina i triklozana, su se pokazale učinkovitijim od samog tobramicina u eradikaciji biofilma *P. aeruginosa* (Maiden i sur., 2018; Shin i sur., 2016). Kao i u prvom dijelu ovog rada, ispitivan je učinak kombinacija eteričnog ulja ili pulegona i tobramicina na planktonske stanice i na sami biofilm. Ispitivanje je provedeno tako što je biofilm prethodno uzgojen, a tek onda su bakterije tretirane nizom koncentracija kombinacija eteričnog ulja mikromerije i pulegona s tobramicinom. Nakon 24-satne inkubacije izmjerena je optička gustoća kulture pri 570 nm, a zatim je provedeno bojanje kristal violetom i odbojavanje octenom kiselinom kao priprema za određivanje količine preostalog biofilma mjerenjem optičke gustoće kulture pri 540 nm. Zbog velike varijacije u apsolutnim vrijednostima optičke gustoće pri 540 nm izmjerenim u različitim ponavljanjima u ovome dijelu nije prikazan biofilm indeks nego su rezultati izraženi preko relativne optičke gustoće u odnosu na netretiranu kulturu. Uz niz koncentracija kombinacija eteričnog ulja/pulegona s tobramicinom promatran je i učinak samog tobramicina na planktonske stanice i biofilm. Zanimljivo je da je sam tobramicin u koncentraciji od 2 µg/mL značajno inhibirao rast planktonskih stanica, ali je značajno potaknuo proizvodnju biofilma. Sve promatrane kombinacije eteričnog ulja mikromerije i tobramicina su također inhibirale rast planktonskih stanica. Učinak je pri svim kombinacijama bio jači nego učinak samog tobramicina, odnosno možemo zaključiti da dolazi do sinergističkog učinka. Učinak

kombinacija je zanimljiviji ukoliko promatramo učinak na razvoj biofilma. Naime, niže koncentracije eteričnog ulja mikromerije (0,002-0,031 mg/mL) su, kao i sam tobramicin, djelovale promotivno na proizvodnju biofilma. Promotivni učinak je za koncentracije 0,002 mg/mL i 0,004 mg/mL bio je jači nego učinak samog tobramicina, odnosno došlo je do sinergističkog djelovanja na razvoj biofilma. Sve ostale koncentracije su antagonizirale učinak samog tobramicina. Više koncentracije (0,062-4 mg/mL) su ipak djelovale inhibitorno na proizvodnju biofilma u odnosu na netretiranu kulturu. Zanimljivo je to da je najveća ispitivana koncentracija od 4 mg/mL pokazala slabiji učinak na planktonske stanice i na biofilm od nekih nižih koncentracija. Slično kao i u prvom dijelu rada, učinak pulegona bio je vrlo sličan učinku eteričnog ulja mikromerije. Sve ispitivane kombinacije pulegona i tobramicina pokazale su inhibitorni učinak na rast planktonskih stanica, a većina (0,016-4 mg/mL) ih je s tobramicinom pokazala sinergistički učinak, odnosno došlo je do jače inhibicije nego pri primjeni samog tobramicina. Samo su tri najniže koncentracije pokazale antagonistički učinak u odnosu na sam tobramicin, a od njih je jedino učinak koncentracije od 0,002 mg/mL bio statistički značajan. Razlika koja je vrlo zanimljiva u odnosu na eterično ulje mikromerije je ta da je pulegon pokazao značajno slabiji antagonistički učinak na djelovanje tobramicina na razvoj biofilma. Ipak, sve promatrane koncentracije pulegona u kombinaciji s tobramicinom su djelovale antagonistički na učinak tobramicina na razvoj biofilma.

Biofilm je složeni mehanizam koji su bakterije razvile u svrhu zaštite koji otežava njihovu eradikaciju. Ovim radom je pokazana kompleksnost problema eradikacije bakterije *P. aeruginosa*, posebno ukoliko je biofilm već formiran. Antibiotici koji se koriste u terapiji, ali i tvari koje su proučavane u ovom i brojnim drugim radovima sa sličnim ciljem, mogu dodatno potaknuti stvaranje biofilma ovisno o koncentraciji i na taj način zapravo postići učinak suprotan od željenog.

Rezultati ovog rada pokazali su da eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegon mogu biti učinkoviti u inibiciji rasta bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno, ali i u kombinaciji s tobramicinom. Potencijalni problem mogu predstavljati koncentracije pri kojima postižemo željeni učinak jer su neke od koncentracija za koje je postignut najbolji željeni učinak prilično visoke. Ipak, ovi rezultati ukazuju na njihov potencijal u liječenju infekcija bakterijom *P. aeruginosa*. Ukoliko je došlo do razvoja biofilma je potreban oprez jer njihova primjena potencijalno može dovesti do pojačanja proizvodnje biofilma. Za

bolje razumijevanje specifičnih mehanizama djelovanja na biofilm u budućnosti je potrebno provesti dodatna istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

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

- Eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegon u dijelu ispitanih subinhibitornih koncentracija učinkovito inhibira rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, ali postoje i subinhibitorne koncentracije pri kojima djeluju promotivno na rast planktonskih stanica i formiranje biofilma.
- Koncentracijski raspon pri kojem se postižu željeni učinci na rast planktonskih stanica i formiranje biofilma je prilično uzak i uglavnom sadrži vrlo visoke koncentracije eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona.
- Različiti učinci eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na planktonske stanice i formiranje biofilma upućuju na kompleksnost mehanizama antimikrobnog i antibiofilm učinka eteričnih ulja.
- Tobramicin pri koncentraciji od 2 μg/mL (što je MIK vrijednost), samostalno i u kombinaciji s nizom različitih koncentracija eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona uspješno inhibira daljnji rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, nakon što je biofilm već formiran. Sve koncentracije eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch djeluju sinergistički s tobramicinom. Niže koncentracije pulegona antagoniziraju učinak tobramicina na planktonske stanice, dok više koncentracije pulegona djeluju sinergistički s tobramicinom.
- Tobramicin pri koncentraciji od 2 μg/mL (što je MIK vrijednost) djeluje promotivno na daljnji razvoj prethodno stvorenog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Eterično ulje vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch samo pri nižim koncentracijama djeluje sinergistički s tobramicinom, dok pri većim koncentracijama antagonizira učinak tobramicina na daljnji razvoj prethodno stvorenog biofilma. Pulegon u svim promatranim koncentracijama antagonizira učinak tobramicina na daljnji razvoj prethodno stvorenog biofilma, što je i poželjno.
- Rezultati ovoga rada će pridonijeti daljnjim istraživanjima u području pronalaska novih potencijalnih izvora terapije za liječenje infekcija izazvanih bakterijom *P. aeruginosa* i očuvanju već postojećih čije je primjena ugrožena pojavom multirezistentnih sojeva.

7. LITERATURA

Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48, 5–16.

Andričević K. Učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*. Diplomski rad, 2019, Sveučilište u Zagrebu.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46, 446-475.

Bazargani MM, Rohloff J. Antibiofilm activity ofessential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Cont*, 2016, 61, 156–164.

Božović M, Ragno R. *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules*, 2017, 22, 290.

Bukvički D, Cirić A, Sokolović M, Vannini L, Nissen L, Novaković M, Vujisić Lj, Asakawa Y, Marin PD. *Micromeria thymifolia* Essential Oil Suppresses Quorum-sensing Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Prod Commun*, 2016, 11, 1903-1906.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J of Food Microbiol*, 2004, 94, 223-253.

Burt SA, Ojo-Fakunle VT, Woertman J, Veldhuizen EJ. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One*, 2014, 9, e93414.

Čabarkapa I, Čolović R, Đuragić O, Popović S, Kokić B, Milanov D, Pezo L. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. *Biofouling*, 2019, 35, 361-375.

Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. New York, Mcgraw-Hill Education, 2016, str. 245-248.

Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents - How P. aeruginosa Can Escape Antibiotics. *Front. Microbiol*, 2019, 10, 913.

Coffey BM, Anderson GG. Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. U: Pseudomonas Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Filloux A, Ramos JL, Humana Press, urednici, New York, NY, 2014, str. 631-641.

De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol*, 2009, 11, 279-88. 39

Dhingra AK, Chopra B, Bhardway S, Dhar KL. Synthesis and Characterization of novel Pulegone derivatives as substitutes of 4-(1,1 dimethylethyl) cyclohexan-1-ol acetate. *J Pharm Res*, 2011, 4, 19-21.

Gužvinec M, Butić I, Jelić M, Bukovski S, Lucić S, Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik*, 2012, 32, 71-80.

Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ, Molin S, Givskov M, Tolker Nielsen T, Bjarnsholt T. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*, 2011, 3(2), 55-65.

Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 215-220.

Kaushik KS, Stolhandske J, Shindell O, Smyth HD, Gordon VD. Tobramycin and bicarbonate synergise to kill planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, but antagonise to promote biofilm survival. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2016, 2, 16006.

Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden Marketing - Tehnička Knjiga,

2005, str. 219-225.

Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 2014, 6, 26–41.

Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol biotechnol*, 2017, 27, 1053-1064.

Macwan SR, Dabhi BK, Aparnathi KD, Prajapati JB. Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2016, 5, 885-901.

Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 2001, 9, 34-39.

Maiden MM, Hunt AMA, Zachos MP, Gibson JA, Hurwitz ME, Mulks MH, Waters CM. Triclosan Is an Aminoglycoside Adjuvant for Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62, e00146-18

Marin MA, Novaković MM, Tešević VV, Kolarević SM, Vuković-Gaičić BS. Antimicrobial activity of the essential oil of wild-growing *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch. *J BioSci Biotechnol*, 2015, 4(1), 29-31.

Miladi H, Mili D, Ben Slama R, Zouari S, Ammar E, Bakhrouf A. Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microb Pathog*, 2016, 93, 22–31.

Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. Front. Cell. Infect. *Microbiol*, 2017, 7, 39.

Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*, 2014, 68, 1-12.

Niu C, Gilbert ES. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70, 6951-6956.

Oumzil H, Choulami S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res*, 2002, 16, 727-731.

Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Virol*, 2015, 89(15), 7449-7456.

Prayle A, Watson A, Fortnum H, Smyth A. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax*, 2010, 65, 654–658.

Savoia D, Zucca M. Clinical and Environmental Burkholderia Strains: Biofilm Production and Intracellular Survival. *Curr Microbiol*, 2007, 54, 440-444.

Shin S, Ahmed I, Hwang J, Seo Y, Lee E, Choi J, Moon S, Cho DW. A Microfluidic Approach to Investigating a Synergistic Effect of Tobramycin and Sodium Dodecyl Sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Analytical Sciences*, 2016, 32, 67-73.

Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J*, 2017, 11, 53–62.

Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid base Compl Alternative Med*, 2016, 2016.

Šavikin KP, Menković NR, Zdunić GM, Tasić SR, Ristić MS, Tević TR, Dajić-Stevanović ZP. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, *M. dalmatica* Benth., and *Satureja cuneifolia* Ten. and its secretory elements. *J Essent Oil Res*, 2010, 22(1), 91-96.

Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*, 2013, 36, 79– 89.

Vitanza L, Maccelli A, Marazzato M, Scazzocchio F, Comanducci A, Fornarini S, Crestoni ME, Filippi A, Fraschetti C, Rinaldi F, Aleandri M, Goldoni P, Conte MP, Ammendolia MG, Longhi C. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microb Pathog*, 2019, 126, 323-331.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa je oportunistički patogen koji izaziva akutne ili kronične infekcije. Akutne infekcije su uzrokovane planktonskim oblikom bakterije. Kronične infekcije se najčešće razvijaju kod pacijenata s kroničnim ranama i imunokompromitiranih pacijenata i za njih su odgovorne kulture koje razviju biofilm. Brojni mehanizmi rezistencije, uključujući i biofilm, koje je ova bakterija razvila pridonose njezinoj otpornosti na djelovanje antibiotika što dodatno otežava odabir učinkovite terapije. Danas je izazov pronaći nove mogućnosti liječenja infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*, ali i ostvariti željeni učinak klasične terapije. Eterična ulja su tvari za koje se zna da posjeduju antimikrobna svojstva, ali mehanizmi djelovanja još nisu detaljno istraženi. Nova istraživanja pokazuju da pojedina eterična ulja imaju i antibiofilm učinak što može pridonijeti napretku terapije kroničnih infekcija *P. aeruginosa.* Cilj ovog rada bio je ispitati učinak eteričnog ulja biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na rast planktonskih stanica i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno i u kombinaciji s tobramicinom nakon formiranja biofilma.

Učinak na planktonske stanice određen je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 570 nm. Količina nastalog biofilma određena je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 540 nm nakon bojenja kristal violetom. Samostalni učinak eteričnog ulja vrste *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na biofilm dodatno je prikazan kao biofilm indeks. Rezultati su pokazali da eterično ulje vrste *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegon u uskom rasponu subinhibitornih koncentracija mogu učinkovito inhibirati rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno i u kombinaciji s tobramicinom. Također je pokazano da eterično ulje vrste *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegon u uskom rasponu subinhibitornih koncentracija mogu inhibirati razvoj biofilma. U kombinaciji s tobramicinom, eterično ulje vrste *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch pri većini koncentracija je antagoniziralo učinak tobramicina na daljnji razvoj biofilma, a pulegon je imao antagonistički učinak pri svim koncentracijama. Ovaj rad će pružiti nove informacije i pridonijeti daljnjim istraživanjima novih mogućnosti liječenja infekcija bakterijom *P. aeruginosa*, ali i očuvanju postojeće terapije.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that causes acute or chronic infections. Acute infections are caused by the planktonic form of the bacterium. Chronic infections most commonly develop in patients with chronic wounds and immunocompromised patients, and are caused by biofilm-developing cultures. Numerous mechanisms of resistance, including biofilm, developed by this bacterium contribute to its antibiotics resistance, which further complicates the choice of effective therapy. Today, the challenge is to find new possibilities for the treatment of infections caused by *P. aeruginosa*, but also to achieve the best possible effect of classical therapy. Essential oils are substances that are known to possess antimicrobial effect, but the mechanisms of their action have not yet been thoroughly investigated. Recent research shows that certain essential oils also have an antibiofilm effect, which may contribute to advances in therapy for the treatment of chronic *P. aeruginosa* infections. The aim of this study was to examine the effect of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone on planktonic cell growth and biofilm formation of *P. aeruginosa* ATCC 27853, alone and combined with tobramycin after biofilm formation.

The effect on planktonic cell growth was determined by measuring the optical density of the culture at 570 nm. The amount of formed biofilm was determined by measuring the optical density of the culture at 540 nm following the crystal violet staining. The independent effect of the *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone on the biofilm was additionally shown as a biofilm index. The results showed that the *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone can in narrow range of subinhibitory concentrations effectively inhibit the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 planktonic cells, alone and combined with tobramycin. It was also observed that the *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone can in narrow range of subinhibitory concentrations inhibit biofilm development. In combination with tobramycin, the *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil at most concentrations antagonized the effect of tobramycin on the further development of the formed biofilm, and pulegone had an antagonistic effect at all observed concentrations. This work will provide new information and contribute to further research on new treatment options for infections caused by *P. aeruginosa*.

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

Učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Iva Sičić

SAŽETAK

Pseudomonas aeruginosa je oportunistički patogen koji izaziva akutne ili kronične infekcije. Akutne infekcije su uzrokovane planktonskim oblikom bakterije. Kronične infekcije se najčešće razvijaju kod pacijenata s kroničnim ranama i imunokompromitiranih pacijenata i za njih su odgovorne kulture koje razviju biofilm. Brojni mehanizmi rezistencije, uključujući i biofilm, koje je ova bakterija razvila pridonose njezinoj otpornosti na djelovanje antibiotika što dodatno otežava odabir učinkovite terapije. Danas je izazov pronaći nove mogućnosti liječenja infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*, ali i ostvariti željeni učinak klasične terapije. Eterična ulja su tvari za koje se zna da posjeduju antimikrobna svojstva, ali mehanizmi djelovanja još nisu detaljno istraženi. Nova istraživanja pokazuju da pojedina eterična ulja imaju i antibiofilm učinak što može pridonijeti napretku terapije kroničnih infekcija *P. aeruginosa.* Cilj ovog rada bio je ispitati učinak eteričnog ulja biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na rast planktonskih stanica i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno i u kombinaciji s tobramicinom nakon formiranja biofilma. Učinak na planktonske stanice određen je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 570 nm. Količina nastalog biofilma određena je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 540 nm nakon bojenja kristal violetom. Samostalni učinak eteričnog ulja vrste *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na biofilm dodatno je prikazan kao biofilm indeks. Rezultati su pokazali da eterično ulje vrste *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegon u uskom rasponu subinhibitornih koncentracija mogu učinkovito inhibirati rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno i u kombinaciji s tobramicinom. Također je pokazano da eterično ulje vrste *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegon u uskom rasponu subinhibitornih koncentracija mogu inhibirati razvoj biofilma. U kombinaciji s tobramicinom, eterično ulje vrste *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch pri većini koncentracija je antagoniziralo učinak tobramicina na daljnji razvoj biofilma, a pulegon je imao antagonistički učinak pri svim koncentracijama. Ovaj rad će pružiti nove informacije i pridonijeti daljnjim istraživanjima novih mogućnosti liječenja infekcija bakterijom *P. aeruginosa*, ali i očuvanju postojeće terapije.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 18 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 39 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, antibiofilm učinak, Micromeria, pulegon, eterično ulje, tobramicin

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. Sanda Vladimir-Knežević, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Daniela Jakšić, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

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 growth and biofilm production of *P. aeruginosa*

Iva Sičić

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that causes acute or chronic infections. Acute infections are caused by the planktonic form of the bacterium. Chronic infections most commonly develop in patients with chronic wounds and immunocompromised patients, and are caused by biofilm-developing cultures. Numerous mechanisms of resistance, including biofilm, developed by this bacterium contribute to its antibiotics resistance, which further complicates the choice of effective therapy. Today, the challenge is to find new possibilities for the treatment of infections caused by *P. aeruginosa*, but also to achieve the best possible effect of classical therapy. Essential oils are substances that are known to possess antimicrobial effect, but the mechanisms of their action have not yet been thoroughly investigated. Recent research shows that certain essential oils also have an antibiofilm effect which may contribute to advances in therapy for the treatment of chronic *P. aeruginosa* infections. The aim of this study was to examine the effect of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone on planktonic cell growth and biofilm formation of *P. aeruginosa* ATCC 27853, alone and combined with tobramycin after biofilm formation. The effect on planktonic cell growth was determined by measuring the optical density of the culture at 570 nm. The amount of biofilm formed was determined by measuring the optical density of the culture at 540 nm, following the crystal violet staining. The independent effect of the *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone on the biofilm was additionally shown as a biofilm index. The results showed that the *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone can in narrow range of subinhibitory concentrations effectively inhibit the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 planktonic cells, alone and combined with tobramycin. It has also been shown that the *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil and pulegone can in narrow range of subinhibitory concentrations inhibit biofilm development. In combination with tobramycin, the *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch essential oil at most concentrations antagonized the effect of tobramycin on the further development of the formed biofilm, and pulegone had an antagonistic effect at all observed concentrations. This paper will provide new information and contribute to further research into new treatment options for infections caused by *P. aeruginosa*, but also to the preservation of existing therapy.

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

Thesis includes: 48 pages, 18 figures, 1 table and 39 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, antibiofilm effect, *Micromeria*, pulegone, essential oil, tobramycin

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
Sanda Vladimir-Knežević, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Jakšić, **Ph.D.** *Postdoctorand*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.