



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Милица Г. Пејчић Пејић

**Антимикробна активност комерцијалних
етарских уља одабраних биљних врста породице
Lamiaceae на клиничке изолате *Pseudomonas
aeruginosa* и *Klebsiella spp.*: антивирулентни и
синергистички потенцијал**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о
ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Ниш, 2024.



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Милица Г. Пејчић Пејић

**Антимикробна активност комерцијалних
етарских уља одабраних биљних врста породице
Lamiaceae на клиничке изолате *Pseudomonas*
aeruginosa и *Klebsiella* spp.: антивирулентни и
синергистички потенцијал**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2024.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Milica G. Pejčić Pejić

**Antimicrobial activity of selected Lamiaceae taxa
commercial essential oils against *Pseudomonas
aeruginosa* and *Klebsiella* spp. clinical isolates: anti-
virulence and synergistic potential**

DOCTORAL DISERTATION

Niš, 2024.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Зорица Стојановић-Радић
Редовни професор на Департману за биологију и екологију,
Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Наслов: Антимикробна активност комерцијалних етарских уља одабраних биљних врста породице Lamiaceae на клиничке изолате *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella* spp.: антивирулентни и синергистички потенцијал

Резиме: Циљеви ове докторске дисертације били су одређивање хемијског састава комерцијалних етарских уља босиљка, жалфије и ртањског чаја, утврђивање њиховог антимикробног и антивирулентног потенцијала, као и способности да повећају активност антибиотика ципрофлоксацина у контроли раста клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella* spp. Ове врсте представљају најчешће патогене сојеве који се одликују повећаном резистенцијом и водећи су узрочници хроничних инфекција због своје способности да продукују биофилм. Хемијска анализа уља показала је високу заступљеност класе монотерпена код сва три уља и високи проценат компоненти α -тујона, камфора, линалола, (*E*)-анетола, тимола и *p*-цимена. Након њихове примене на изолате *P. aeruginosa*, уља босиљка и жалфије су показала антимикробну активност у опсегу 5-20 mg/ml, а уље ртањског чаја од 0,63 до 10 mg/ml. Када су примењена на изолате *Klebsiella* spp., опсег активности уља босиљка кретао се од 2,5-10 mg/ml, 1,25-5 mg/ml за уље ртањског чаја, док је уље жалфије било активно само у концентрацијама већим од 20 mg/ml. Резултати указују на редукујући потенцијал тестираних уља у свим испитиваним фазама развоја биофилма и да у потпуности разграђују формирано зрео биофилм код изолата *P. aeruginosa*, док је код изолата *Klebsiella* spp. тај ефекат нешто слабији. Резултати тестова у којима је испитана активност уља на остале факторе вируленције *P. aeruginosa* показују да сва три уља значајно смањују продукцију пиоцијанина, док уља босиљка и жалфије показују и способност редукације покрета изолата *P. aeruginosa*, што није уочено након примене уља ртањског чаја. Тестирана уља довела су и до повећања активности антибиотика ципрофлоксацина након примене на наведене клиничке изолате.

Научна област: Биолошке науке
Научна дисциплина: Микробиологија

Кључне речи: Мултирезистенција, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., фактори вируленције, биофилм, покрети, пиоцијанин, етарска уља, синергизам

УДК: 543.95+665.52:[582.929.4:579.841.1

CERIF
класификација:

B 230

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD Zorica Stojanović-Radić Full professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš
Title:	Antimicrobial activity of selected Lamiaceae taxa commercial essential oils against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Klebsiella</i> spp. clinical isolates: anti-virulence and synergistic potential
Abstract:	<p>The objectives of this doctoral dissertation were to determine the chemical composition of commercial basil, sage, and winter savory essential oils, to establish their antimicrobial and antivirulent potentials as well as their ability to enhance the activity of the antibiotic ciprofloxacin in the controlling the growth of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Klebsiella</i> spp. clinical isolates. These species represent the most common pathogenic strains characterized by increased resistance and are leading causes of chronic infections due to their ability to produce biofilm.</p> <p>The chemical analysis of the oils revealed a high prevalence of the monoterpene class in all three oils and a high content of the components α-thujone, camphor, linalool, (<i>E</i>)-anethole, thymol and <i>p</i>-cymene. After their application to <i>P. aeruginosa</i> isolates, basil and sage oils showed antimicrobial activity in the range of 5-20 mg/ml, while winter savory oil activity ranged from 0.63 to 10 mg/ml. When applied to <i>Klebsiella</i> spp. isolates, the activity range of the basil oil was 2.5-10 mg/ml, 1.25-5 mg/ml for winter savory oil, while sage oil was active only in concentrations higher than 20 mg/ml. The results indicate the reducing potential of the tested oils in all tested biofilm formation stages, and that they completely degrade the mature biofilm in <i>P. aeruginosa</i> isolates, while in <i>Klebsiella</i> spp. that effect is somewhat lower. The results from the tests investigating the activities of the oils on other <i>P. aeruginosa</i> virulence factors showed that all three oils significantly reduce pyocyanin production, while basil and sage oils showed abilities to reduce motility in <i>P. aeruginosa</i> isolates, which was not observed after the application of winter savory oil. The tested oils also led to increased activity of the antibiotic ciprofloxacin after application to the mentioned clinical isolates.</p>
Scientific Field:	Biological sciences
Scientific Discipline:	Microbiology
Key Words:	Multiresistance, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> spp., virulence factors, biofilm, motility, pyocyanin, essential oils, synergism
UDC:	543.95+665.52:[582.929.4:579.841.1

CERIF
Classification:

B 230

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милица Пејчић Пејић
Ментор, МН:	Зорица Стојановић-Радић
Наслов рада, НР:	Антимикробна активност комерцијалних етарских уља одабраних биљних врста породице Lamiaceae на клиничке изолате <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Klebsiella</i> spp.: антивирулентни и синергистички потенцијал
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2024.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	7 поглавља, 191 страна, 344 цитата, 18 табела, 29 слика, 7 прилога
Научна област, НО:	Биолошке науке
Научна дисциплина, НД:	Микробиологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Мултирезистенција, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> spp., фактори вируленције, биофилм, покрети, пиоцијанин, етарска уља, синергизам
УДК	543.95+665.52:[582.929.4:579.841.1
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, ИЗ:

Циљеви ове докторске дисертације били су одређивање хемијског састава комерцијалних етарских уља босиљка, жалфије и ртањског чаја, утврђивање њиховог антимикробног и антивирулентног потенцијала, као и способности да повећају активност антибиотика ципрофлоксацина у контроли раста клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella* spp. Ове врсте представљају најчешће патогене сојеве који се одликују повећаном резистенцијом и водећи су узрочници хроничних инфекција због своје способности да продукују биофилм.

Хемијска анализа уља показала је високу заступљеност класе монотерпена код сва три уља и високи проценат компоненти α -тујона, камфора, линалола, (E)-анетола, тимола и *p*-цимена. Након њихове примене на изолате *P. aeruginosa*, уља босиљка и жалфије су показала антимикробну активност у опсегу 5-20 mg/ml, а уље ртањског чаја од 0,63 до 10 mg/ml. Када су примењена на изолате *Klebsiella* spp., опсег активности уља босиљка кретао се од 2,5-10 mg/ml, 1,25-5 mg/ml за уље ртањског чаја, док је уље жалфије било активно само у концентрацијама већим од 20 mg/ml. Резултати указују на редукујући потенцијал тестираних уља у свим испитиваним фазама развоја биофилма и да у потпуности разграђују формирано зрело биофилм код изолата *P. aeruginosa*, док је код изолата *Klebsiella* spp. тај ефекат нешто слабији. Резултати тестова у којима је испитана активност уља на остале факторе вируленције *P. aeruginosa* показују да сва три уља значајно смањују продукцију пиоцијанина, док уља босиљка и жалфије показују и способност редукције покрета изолата *P. aeruginosa*, што није уочено након примене уља ртањског чаја. Тестирана уља довела су и до повећања активности антибиотика ципрофлоксацина након примене на наведене клиничке изолате.

Датум прихватања теме, ДП:

08.02.2021.

Датум одбране, ДО:

Чланови комисије, КО: Председник:

Члан:

Члан, ментор:



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	Monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Milica Pejčić Pejić
Mentor, MN :	Zorica Stojanović-Radić
Title, TI :	Antimicrobial activity of selected Lamiaceae taxa commercial essential oils against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Klebsiella</i> spp. clinical isolates: anti-virulence and synergistic potential
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2024
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	7 chapters, 191 pages, 344 references, 18 tables, 29 pictures, 7 appendixes
Scientific field, SF :	Biological sciences
Scientific discipline, SD :	Microbiology
Subject/Key words, S/KW :	Multiresistance, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> spp., virulence factors, biofilm, motility, pyocyanin, essential oils, synergism
UC	543.95+665.52:[582.929.4:579.841.1
Holding data, HD :	Library
Note, N :	

Abstract, AB :	<p>The objectives of this doctoral dissertation were to determine the chemical composition of commercial basil, sage, and winter savory essential oils, to establish their antimicrobial and antivirulent potentials as well as their ability to enhance the activity of the antibiotic ciprofloxacin in the controlling the growth of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Klebsiella</i> spp. clinical isolates. These species represent the most common pathogenic strains characterized by increased resistance and are leading causes of chronic infections due to their ability to produce biofilm.</p> <p>The chemical analysis of the oils revealed a high prevalence of the monoterpene class in all three oils and a high content of the components α-thujone, camphor, linalool, (<i>E</i>)-anethole, thymol and <i>p</i>-cymene. After their application to <i>P. aeruginosa</i> isolates, basil and sage oils showed antimicrobial activity in the range of 5-20 mg/ml, while winter savory oil activity ranged from 0.63 to 10 mg/ml. When applied to <i>Klebsiella</i> spp. isolates, the activity range of the basil oil was 2.5-10 mg/ml, 1.25-5 mg/ml for winter savory oil, while sage oil was active only in concentrations higher than 20 mg/ml. The results indicate the reducing potential of the tested oils in all tested biofilm formation stages, and that they completely degrade the mature biofilm in <i>P. aeruginosa</i> isolates, while in <i>Klebsiella</i> spp. that effect is somewhat lower. The results from the tests investigating the activities of the oils on other <i>P. aeruginosa</i> virulence factors showed that all three oils significantly reduce pyocyanin production, while basil and sage oils showed abilities to reduce motility in <i>P. aeruginosa</i> isolates, which was not observed after the application of winter savory oil. The tested oils also led to increased activity of the antibiotic ciprofloxacin after application to the mentioned clinical isolates.</p>
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	08.02.2021.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB : President:	
Member:	
Member, Mentor:	

Захвалница

Најсрдачније и са пуно поштовања захваљујем се свом ментору и узору, проф. др Зорици Стојановић-Радић, на пријатељском приступу, указаном поверењу, разумевању, великом стрпљењу и вођењу кроз истраживачки рад током свих ових година. Хвала за све корисне савете, пренесено знање и што сте увек били ту.

Велику захвалност дугујем и проф. др Нику Радуловићу на стручној помоћи и корисним саветима током свих ових година истраживачког рада.

Захваљујем се и проф. др Марији Генчић и Милицы Нешић на стручној помоћи из области хемије.

Огромну захвалност дугујем Марини Димитријевић, колегиници, пријатељици и сапутнику у лабораторијском раду која је дане проведене у лабораторији учинила лепшим и лакшим.

Хвала и др Вишњи Мадич на свим корисним саветима, креативним идејама и верном пријатељству.

Захваљујем се и својим родитељима Горану и Горици, сестри Јелици и браћи Милану и Милошу на љубави и несебичној подршци коју ми пружају.

Највећу захвалност дугујем супругу Славиши, који је увек веровао у мене и оно што радим, на великом стрпљењу, на неизмерној подршци, љубави и свакодневном охрабривању.

Милица

Ознаке и скраћенице

Номенклатура

n - нормални низ

p - пара

E - Ентгеген (стереодескриптор)

Z - Зузаммен (стереодескриптор)

Мерне јединице

°C - Целзијусов степен

Mbp - мега базни пар

% - проценат

mm - милиметар

nm - нанометар

µm - микрометар

min - минут

h - сат

s - секунда

ml - милилитар

µl - микролитар

mg - милиГрам

g - Грам

g/l - Грам по литру

CFU - eng. Colony forming unit (број формираних колонија)

CFU/ml - број формираних колонија у једном милилитру

eV - електрон Волт

m/z - однос масе и наелектрисања

rpm - eng. Revolution per minute (број обртаја у минути)

amu – eng. Atomic Mass Unit

Реагенси и растварачи

EtOH - етанол

NaCl - натријум хлорид

Et₂O - диетил етар

DMCO - диметилсулфоксид

ТТЦ - 2,3,5-трифенилтетразолијум-хлорид

PBS - eng. Phosphate buffer saline (слани раствор са фосфатним пуфером)

CV - кристал виолет

HCl - хлороводоонична киселина

Подлоге

ХА - хранљиви агар

МХА - Милер Хинтон агар

ТСБ - Триптон соја бујон

Крвни агар

Swimm agar- полутечна подлога коришћена за одређивање покрета пливања

Swarm agar - получврста подлога коришћена за покрете ројења

Twitch agar - чврста подлога коришћена за покрете трзања

Технички агар

Екстракт квасца

Триптон

Глукоза

Остало

H₂S - водооник сулфид

Spp - species

MRSA - метицилин резистентан *Staphylococcus aureus*

ВП - Вогес Проскауер

ЕћМ - екстраћелијски матрикс

АХЛ - Ацил хомосерински лактони

ДНК - Дезоксирибоуклеинска киселина

QS - eng. Quorum-sensing

ОдДХЛ - N-(3-оксодеканонил)-L-хомосерински лактони

БХЛ - N-бутаноил-L-хомосерински лактони

PQS - eng. *Pseudomonas* quinolone signals

еДНК - екстрацелуларна (ванћелијска) дезоксирибонуклеинска киселина

ЛПС - Функционални липополисахарид

ППК - полифосфатне киназе

CPS - специфични капсуларни полисахариди

Рел. инт. - релативни интензитет

ТЗП - пиперацилин-тозобактам

ИМП - имипенем

МЕР - меропенем

ЦФПМ - цефепим

ЦФТ - цефтазидим

ЦПР - ципрофлоксацин

АМК - амикацин

АМП - ампицилин

ГЕН - гентамицин

ЛВХ - левофлоксацин

ФОС - фосфомицин

ЦЕХ - цефалексин

ЦТХ - цефотаксим

ЦХМ - цефуроксим

ЦФЕ - цефиксим

СХТ - триметоприм-сулфаметазол

АМЦ - амоксицилин-клавулонска киселина

С - осетљив

И - интермедијарно осетљив

Р - резистентан

МИК - минимална инхибиторна концентрација

ФИКИ - индекс фракционе инхибиторне концентрације

ФИК - фракциони инхибиторни коефицијент

ОД - оптичка густина

ОД_г - гранична вредност оптичке густине

ОД_н - оптичка густина негативне контроле

СД - стандардна девијација

ГХ - гасна хроматографија

ГХ-МС - гасна хроматографија-масена спектрометрија

ГЦ-ФИД - Гасна хроматографија са пламенским јонизационим детектором

Син. - синоним

Р_т - ретенционо време (eng. Retention Time)

РИ - ретенциони индекс у односу на *n*-алкане

МС - индентитет компоненти утврђен поређењем њихових масених спектра
КоИ - индентитет компоненти додатно потврђен коинекцијом аутентичног узорка
н.д. - није детектовано
тр. - трагови
Мс - масени спектар
М - монотерпеноиди
МО - оксигеновани монотерпеноиди
С - сесквитерпеноиди
СО - ровани монотерпеноид
ФАД - масне киселине и једињења изведена из метаболизма масних киселина
СМ - једињења шикиматног пута
О - остало
Бр. - Број
ЕО - Етарско уље
LD50 - редукција преко 50% укупне величине популације
БЦ - босиљак/ципрофлоксацин
ЖЦ - жалфија/ципрофлоксацин
РЦ - ртањски чај/ципрофлоксацин
БР - босиљак/ртањски чај
С - синергистички ефекат
Ад - адитивни ефекат
И - индиферентан ефекат
Ан - антагонистички ефекат
ANOVA - eng Analysis of variance (Анализа варијансе)
МДР - eng. multidrug resistance
АТСС - eng. American Type Culture Collection
NCTC - eng. National Collection Type Culture
АТП - аденозин трифосфат
ЕПС - егзополисахарида

САДРЖАЈ

1.	УВОД	1
1.1.	Основне карактеристике <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.2.	Основне карактеристике рода <i>Klebsiella</i>	4
1.3.	Фактори вируленције	7
1.3.1.	Биофилм	8
1.3.1.1.	Формирање биофилма.....	11
1.3.1.2.	Комуникација ћелија у биофилму	14
1.3.1.3.	Механизми резистенције бактерија у биофилму	15
1.3.1.4.	Формирање и резистенција биофилма код <i>P. aeruginosa</i>	16
1.3.1.5.	Формирање и резистенција биофилма код врсте рода <i>Klebsiella</i>	20
1.3.2.	Покретљивост <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.3.3.	Пиоцијанин	23
1.3.4.	Капсуле.....	24
1.4.	Етарска уља	25
1.4.1.	Етарска уља жалфије, босиљка и ртањског чаја	26
1.4.2.	Антимикробна активност етарских уља и интеракција са конвенционалним антибиотцима - Преглед литературе	38
1.4.3.	Антибиофилм и антивирулентни ефекат етарских уља и њихових компоненти - Преглед литературе	40
2.	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	42
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	43
3.1.	Етарска уља	43
3.2.	Бактеријски сојеви.....	43
3.3.	Гасна хроматографија са масеном спектрометријом (ГХ-МС)	44
3.4.	Осетљивост изолата на антибиотике	44
3.5.	Испитивање антимикробне активности етарских уља.....	45

3.6. Одређивање активности етарских уља током времена и формирања криве раста.....	46
3.7. Одређивање типа интеракције антимикробних агенаса	46
3.8. Продукција биофилма	47
3.8.1. Продукција биофилма у фази пре адхезије (Pre-adhesion biofilm formation). 47	
3.8.2. Формирање биофилма након фазе адхезије (Post-adhesion biofilm formation)	48
3.8.3. Формирање зрелог биофилма	48
3.9. Антибиофилм тестови.....	49
3.10. Фактори вируленције	49
3.10.1. Тестови покретљивости.....	49
3.10.2. Ефекат етарских уља на покрете пливања, ројења и трзања.....	50
3.10.3. Продукција пиоцијанина	50
3.10.4. Утицај етарских уља на продукцију пиоцијанина.....	51
3.11. Статистичка обрада података.....	51
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	52
4.1. Хемијска карактеризација уља жалфије, босиљка и ртањског чаја.....	52
4.2. Осетљивост изолата <i>P. aeruginosa</i> на антибиотике	61
4.3. Продукција биофилма	63
4.4. Продукција биофилма након третмана уљима босиљка и жалфије у фази пре адхезије- скрининг студија	64
4.5. Антимикробна активност комерцијалних етарских уља	68
4.6. Ефекат етарских уља на раст изолата <i>P. aeruginosa</i>	75
4.7. Карактеризација фактора вируленције клиничких изолата <i>P. aeruginosa</i>	81
4.8. Утицај етарских уља на продукцију биофилма <i>P. aeruginosa</i>	83
4.8.1. Формирање биофилма у фази пре адхезије (Pre-adhesion biofilm formation) 83	
4.8.2. Формирање биофилма након фазе адхезије (Post-adhesion biofilm formation)	88

4.8.3. Зрео биофилм.....	94
4.9. Утицај етарских уља на различите типове покрета	101
4.10. Утицај етарских уља на продукцију пиоцијанина	108
4.11. Тип интеракције између антимикуробних агенаса	110
4.12. Осетљивост изолата <i>Klebsiella</i> spp. на антибиотике	115
4.13. Антимикуробна активност етарских уља босиљка, жалфије и ртањског чаја на изолате рода <i>Klebsiella</i>	118
4.14. Ефекат етарских уља на раст изолата <i>Klebsiella</i> spp.	122
4.15. Продукција биофилма изолата <i>Klebsiella</i> spp.....	126
4.16. Ефекат етарских уља на продукцију биофилма изолата <i>Klebsiella</i> spp.....	128
4.16.1. Формирање биофилма у фази пре адхезије (Pre-adhesion biofilm formation)	128
4.16.2. Ефекат етарских уља на продукцију биофилма након фазе адхезије изолата <i>Klebsiella</i> spp. (Post-adhesion biofilm formation)	131
4.16.3. Ефекат етарских уља на деградацију зрелог биофилма изолата <i>Klebsiella</i> spp.....	134
4.17. Тип интеракције између антимикуробних агенаса код изолата <i>Klebsiella</i> spp.	137
5. ЗАКЉУЧАК.....	140
6. ЛИТЕРАТУРА.....	142
7. ПРИЛОЗИ	180

1. УВОД

Врсте рода *Klebsiella* као и *Pseudomonas aeruginosa* спадају у опортунистичке патогене, чија је карактеристика производња биофилма. Захваљујући овој и другим физиолошким особинама, оне су водећи узрочници интрахоспиталних инфекција и могу изазвати упалу плућа, уринарне инфекције, као и сепсу (Adonizio et al., 2008; Alhazmi, 2015; Neog et al., 2021; Qin et al., 2022; Fernández-Billón et al., 2023; Neog et al., 2021; Agneswari et al., 2023). *Pseudomonas aeruginosa* је један од главних патогена који изазива инфекције ока, коже, мокраћног и респираторног тракта, као и системске инфекције код имунокомпромитованих особа (Qin et al., 2022; Shao et al., 2022; Edward et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Поред могућности формирања биофилма, који представља значајан фактор патогености, вируленцији доприносе и покретљивост, као и продукција пигмента. Припадници рода *Klebsiella* најчешће су изоловани из узорака пацијената који пате од хроничних болести попут дијабетес мелитуса или хроничне опструктивне болести плућа. Капсуле представљају кључни фактор вируленције овог рода, а степен вирулентности увелико зависи од типа капсуле, односно њених антигена. Вируленцији доприносе и продукција ендотоксина, као и различити типови фимбрија које представљају нефлагеларне, филаментозне израштаје на површини бактерије и имају улогу у адхеренцији за ћелије домаћина (Vuotto et al., 2014; McCartney & Hoyles, 2023; Dan et al., 2023; Kaspersen et al., 2023).

У медицини биофилмови се повезују са бројним хроничним инфекцијама, које су последица њиховог развоја на катетерима, протезама, имплантатима и другим медицинским направама од метала или пластичних полимера, који се налазе у људском организму (Bjarnsholt, 2013). Инфекције изазване бактеријама које продукују биофилм данас су један од најактуелнијих проблема у бактериологији. Антибиотска терапија елиминисе само планктонске ћелије, док сесилни облици преживљавају, шире се у биофилму и настављају да се размножавају после завршене терапије. Утврђено је да је чак до 80% хуманих инфекција повезано са продукцијом и формирањем биофилма (Fernández-Billón et al., 2023).

Мултирезистентност бактерија је велики проблем у третману инфекција које изазивају (Ciofu & Tolker-Nielsenruth, 2019; Alshammari et al., 2023). Интензивна примена широког спектра антибиотика за третирање хуманих патогених сојева подстакла је развој отпорности на више врста антибиотика (Navon-Venezia et al., 2017). Резистенција,

као и добра прилагођеност ових врста на факторе спољашње средине заснивају се на могућности брзе промене фенотипских карактеристика. Боље разумевање механизма међућелијске комуникације (енг. quorum sensing), која је основа за развој биофилмова и формирање резистентних заједница, може бити корисно за стварање нових стратегија којима би се контролисале упорне инфекције.

Секундарни биљни метаболити попут етарских уља су познати по својој биолошкој активности. Етарска уља су сложене мешавине ароматичних испарљивих компоненти, које захваљујући комплексном хемијском саставу имају бројне биолошке активности, попут антимицробне, антиоксидативне, антиинфламаторне и многих других (Baratta et al., 1998; Tariq et al., 2019; Sousa et al., 2022). Користе се у традиционалној медицини, али су и од великог интереса и значаја у фармацеутској индустрији и индустрији хране (Brenes & Roura, 2010; Tariq et al., 2019; Hou et al., 2022).

С обзиром на бројне предности коју имају етарска уља (нижа токсичност и смањена могућност за појаву резистенције услед комплексног хемијског састава) у односу на синтетичке агенсе, њихово истраживање и коришћење није само интерес, већ је постало потреба. Предност једињења биљног порекла у односу на синтетичка средства је у томе што због своје комплексности могу утицати на више циљних места, док су синтетичка средства углавном дизајнирана да делују на једну структуру или процес у ћелији (Tariq et al., 2019; Hou et al., 2022). Истраживања етарских уља и/или њихових појединачних компоненти представљају потенцијалну стратегију за повећање ефикасности постојећих антибиотика и спречавање ширења резистенције. Међутим, потребна су бројна испитивања о њиховом начину деловања и могућим токсиколошким ефектима у циљу оптимизације њихове потенцијалне употребе.

Досадашња истраживања су оправдала примену етарских уља биљака из фамилије Lamiaceae у етномедицини и као суплементарне терапије у савременој медицини. С обзиром да етарска уља која се могу наћи у продаји имају различити хемијски састав и чистоћу у поређењу са уљима која се добијају у лабораторијама за научне сврхе, као и да се у сврхе алтернативне и суплементарне терапије користе као готови комерцијално доступни производи, у овом истраживању коришћена је ова форма етарских уља. Приликом одабира етарских уља за испитивање у овом истраживању, у обзир су узети и доступност као и прихватљиве цене на тржишту.

1.1. Основне карактеристике *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa је опортунистички патоген који изазива различите инфекције особа са ослабљеним имунитетом и представља једног од најчешћих узрочника интрахоспиталних инфекција (Adonizio et al., 2008; Stanković Nedeljković et al., 2011; Alhazmi, 2015; Qin et al., 2022; Huang et al., 2023; Fernández-Billón et al., 2023). Врло је отпорна бактерија, узрокује пнеумоније (цистична фиброза), уринарне инфекције, инфекције рана, сепсе, системске инфекције код особа са сниженим имунитетом (Hou et al., 2012; Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019; Qin et al., 2022; Shao et al., 2022; Edward et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023) и један је од главних патогена који изазива инфекције ока (Hou et al., 2012). У Европи је чак 9% болничких инфекција изазвано овим патогеном, што га чини четвртим најчешћим патогеном у болницама на овом континенту (Qin et al., 2022).

Ова бактеријска врста представља Грам негативне неспорилиштуће бациле који немају капсулу (Alhazmi, 2015; Abdul-Hussein & Atia, 2016). Ћелије су покретне, имају једну флагелу, а поседују и пиле (Shao et al., 2022; de Sousa et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Колоније су крупне и разливане (Alhazmi, 2015). Спадају у аеробне микроорганизме и добро расту на обичним подлогама на температури од 37 °C. Распрострањени у земљишту, води, али и на људима, животињама и биљкама (Abdul-Hussein & Atia, 2016; Ghssein & Ezzeddine, 2022). Ове бактерије показују позитивну глукоза реакцију, лактоза негативну, индол и уреа негативне, а каталаза и оксидаза позитивне реакције и не продукују водоник сулфид (Su et al., 2018) (Табела 1.).

Интензивна примена широког спектра антибиотика за третирање *P. aeruginosa* подстакла је развој отпорности на више врста антибиотика (мултирезистенција), што представља велики проблем у третману инфекција које изазива (Adonizio et al., 2008; Alhazmi, 2015; Moradali et al., 2017; Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019; Pang et al., 2019; Qin et al., 2022; Ramsay et al., 2023, Ye et al., 2022). Уочена је отпорност на аминогликозидне антибиотике, кинолоне и β-лактамске антибиотике (Pang et al., 2019; Qin et al., 2022).

Једна од најважнијих карактеристика ове врсте је производња пигмента. Карактеристичан пигмент плаво-зелене боје назива се пиоцијанин, растворљив је у води и по хемијском саставу је дериват феназина (Stanković Nedeljković et al., 2011; El-Fouly et al., 2015; Abdul-Hussein & Atia, 2016). Други пигмент карактеристичан за ову врсту је флуоресцентни жутозелени пигмент пиовердин.

Табела 1. Биохемијске реакције врсте *Pseudomonas aeruginosa*.

Карактеристике	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Индол	-
Уреа	-
Каталаза	+
Оксидаза	+
H ₂ S (водоник сулфид)	-

(+) = позитивне биохемијске реакције

(-) = негативне биохемијске реакције

Пиовердин у својој структури садржи дихидроксикинолинске деривате, карбоксилну киселину или амиде и кратке тип-специфичне пептиде (који садрже око 6-12 аминокиселина). Код свих сојева пептидни део молекула је исти, док постоји разлика у ацил групи међу сојевима. Постоје три типа пиовердина који су означени као I, II и III (Stanković Nedeljković et al., 2011; Ghssein & Ezzeddine, 2022).

Pseudomonas aeruginosa је веома прилагодљив организам који може да расте на разним подлогама и мења своје карактеристике као одговор на промене у окружењу. Поседује велики геном који садржи 6,26 Mbp (5567 гена) (Lambert, 2002; Alhazmi, 2015; Moradali et al., 2017; Pang et al., 2019). За основне потребе ћелије, попут раста и деобе ћелија потребно је свега око 1500 гена. Према томе, додатни генетски капацитет ове бактеријске врсте је изузетно велики, што објашњава његову високо прилагодљивост на услове средине и могућност развоја отпорности на велики број антибиотика (Lambert, 2002; Pang et al., 2019).

1.2. Основне карактеристике рода *Klebsiella*

Представници рода *Klebsiella* су Грам негативни, непокретни бацили који припадају фамилији Enterobacteriaceae (Neog et al., 2021). Спадају у аспорогене аеробне микроорганизме који поседују капсулу и фимбрије са адхерентним својствима, али немају флагеле (Neog et al., 2021; Agneswari et al., 2023). Капсула и фимбрије представљају факторе вируленције (Vuotto et al., 2014). Врсте овог рода добро расту на подлогама широке намене на температури од 37 °C. Колоније су крупне, сиво-беле, мукозне и разливане. Могу се наћи у површинској води, земљишту, канализацији, на биљкама, а могу колонизовати и слузокожу сисара (Martin & Bachman, 2018; Neog et al., 2021; McCartney & Hoyles, 2023).

Ове бактерије поседују изразиту биохемијску активност. Показују позитивну реакцију у Вогес-Проскауер тесту, продукују лизин декарбоксилазу али не и орнитин декарбоксилазу. Роду *Klebsiella* припадају четири врсте: *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena* и *K. planticola*. Врста *K. pneumoniae* дели се на подврсте *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* ssp. *rhinoscleromatis* и *K. pneumoniae* ssp. *aerogenes*. Врсте се могу идентификовати на основу карактеристика приказаних у Табели 2 (Podschun & Ullmann, 1998).

Табела 2. Биохемијске реакције *Klebsiella* spp. (Podschun & Ullmann, 1998).

Карактеристике	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>Klebsiella</i> <i>oxytoca</i>	<i>Klebsiella</i> <i>terrigena</i>	<i>Klebsiella</i> <i>planticola</i>	<i>Klebsiella</i> <i>ornithinolytica</i>
Индол	-	+	-	В	+
Орнитин декарбоксилаза	-	-	-	-	+
Лизин декарбоксилаза	+	+	+	+	+
Деградација пектина	-	+	-	-	-
Гас из лактозе на 44,5 °C	+	-	-	-	-
Раст на 10 °C	-	+	+	+	+
^a D-мелезитоза	-	В	+	-	-
^b L-сорбоза	В	+	+	+	
^b m- хидроксибензоат	-	+	+	-	-
^г Хидрокси-L- пролин	В	В	В	+	
^д малонат	+	+	+	+	+
Метил црвено тест	-	-	+	В	+
^е ВП	+	+	+	+	+

в: варијабилна реакција; + : позитивна реакција; - : негативна реакција;

^a продукција киселине као последица ферментације D-мелезитозе;

^b продукција киселине као последица ферментације L-сорбозе;

^в ферментација m-хидроксибензоата;

^г ферментација хидрокси-L-пролина;

^д Коришћење малоната као извора угљеника и енергије за раст

^е Вогес-Проскауер тест

Klebsiella spp. су веома прилагодљиви организми због свог великог генома. Геном врсте *K. pneumoniae* састоји се од 5000-6000 гена који омогућују брзу промену фенотипских карактеристика, кодирају специфичне факторе вируленције и механизме антибиотске резистенције (Martin & Bachman, 2018).

Врсте рода *Klebsiella* су познати узрочници интрахоспиталних инфекција, бактеријских пнеумонија, уринарних инфекција, као и инфекција крви и меких ткива (Podschun & Ullmann, 1998; Martin & Bachman, 2018; Dan et al., 2023; Kaspersen et al., 2023; McCartney & Hoyles, 2023). Идентификоване су као трећи водећи узрочник интрахоспиталних инфекција у САД-у (9,9%), одмах иза *Clostridium difficile* и *S. aureus* (Martin & Bachman, 2018). Нозокомијалне (интрахоспиталне) инфекције изазване овим патогенима углавном укључују обољења уринарног или респираторног система, а често су узрочници и неонаталне сепсе (Podschun & Ullmann, 1998).

Као опортунистички патогени, *Klebsiella* spp. примарно инфицирају хоспитализоване пацијенте који пате од хроничних болести попут дијабетес мелитуса, хроничне опструктивне болести плућа и пацијенте са неуропатском дисфункцијом бешике (Podschun & Ullmann, 1998). Највећи клинички значај међу врстама рода *Klebsiella* имају *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* (Neog et al., 2021; McCartney & Hoyles, 2023). Најчешћи изазивач болничких инфекција је *K. pneumoniae* (Dan et al., 2023; Kaspersen et al., 2023; Yang et al., 2023) док се последњих година *K. oxytoca* такође често среће код хоспитализованих пацијената (Neog et al., 2021). *Klebsiella pneumoniae* је изазивач неонаталне сепсе у 16-28% случајева у земљама у развоју (Khaertynov et al., 2018). Ова врста је такође окарактерисана као други водећи узрочник инфекција крви, одмах иза *E. coli* са степеном смртности око 30%, а степен смртности код пнеумонија изазваних *K. pneumoniae* износи чак 50% (Martin & Bachman, 2018).

Поред наведеног, *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* представљају мултирезистентне сојеве који постају све већи проблем у медицини (Neog et al., 2021; Yang et al., 2023; Dan et al., 2023). Уочена је резистенција на β -лактамске антибиотике и флуорокинолоне, међу којима су цефтазидим, ципрофлоксацин и имипенем, што чини инфекције изазване овим сојевима изазовним за лечење (Ashwath et al., 2022; Yang et al., 2022). Посебну пажњу захтева карбопенем-резистентни хипервирулентни сој *K. pneumoniae* који изазива инфекције које се тешко лече до сада познатим антибиотицима (Han et al., 2022). *Klebsiella oxytoca* показује резистенцију на ампицилин, амоксицилин, цефтриаксон, цiproфлоксацин и тетрациклин (Neog et al., 2021).

1.3. Фактори вируленције

Вируленција представља способност патогена да инфицира или уништи ткива домаћина. Фактори вируленције микроорганизмима обезбеђују одбрану од имуног система домаћина и његову бољу колонизацију (Sharma et al., 2017; Qin et al., 2022).

Pseudomonas aeruginosa се карактерише различитим факторима вируленције који доприносе патогености и резистенцији на различите антибиотике (Adonizio et al., 2008; Strateva & Mitov, 2011; Alhazmi, 2015; Edward et al., 2023) и заштити од имуног система домаћина (Sánchez-Jiménez et al., 2023). Фактори вируленције груписани су у ћелијске факторе (нпр. адхезини и липополисахариди) и ванћелијске (секреторне) као што су егзотоксин А, протеазе, егзоензими, фосфолипаза Ц (α -токсин), аглинат и пиоцијанин (Strateva & Mitov, 2011; Edward et al., 2023). Вируленција сваког соја *P. aeruginosa* је пропорционална његовој способности формирања биофилма, различитим типовима покрета као и продукцији токсина и пигмента (O'May & Tufenkji, 2011; Qin et al., 2022; Seder et al., 2022; Edward et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Различити типови покрета имају битну улогу у бактеријској колонизацији површина и формирању биофилмова (O'May & Tufenkji, 2011), а пиоцијанин изазива оксидативни стрес и доводи до смрти ћелија домаћина (Zhou et al., 2017; Edward et al., 2023).

На основу испитивања механизма инфекције врста рода *Klebsiella*, идентификован је велики број фактора који доприносе њиховој патогенези, укључујући капсуле, фимбрије, као и продукцију биофилма, сидерофора и ендотоксина (Podschun & Ullmann, 1998; Schroll et al., 2010; Dan et al., 2023).

Експресија већине фактора вируленције контролисана је quorum-sensing (QS) системом (Strateva & Mitov, 2011; O'May & Tufenkji, 2011; Qin et al., 2022). QS представља комуникациону шему која омогућује бактеријама да детектују густину популације преко сигналних молекула и да на тај начин контролишу експресију гена (Adonizio et al., 2008; Zhou et al., 2017; Goswami et al., 2023). Велики геном (и додатни генски капацитет) омогућују сојевима који их поседују брзу промену фенотипских карактеристика, што доприноси њиховој доброј прилагођености спољашњим факторима али и резистенцији на антибиотике (Martin & Bachman, 2018; Pang et al., 2019). Сазнања о молекуларним механизмима који су укључени у развој биофилмова и формирању резистентних заједница могу бити корисна за стварање нових стратегија којима би се контролисало формирање биофилмова и искорениле упорне инфекције.

1.3.1. Биофилм

У природним екосистемима микроорганизми се могу наћи у два облика, као појединачне ћелије које слободно пливају у течном медијуму (планктонски организми) или као сесилне заједнице које називамо биофилмови (Vraneš & Leskovar, 2009; Alotaibi & Bukhari, 2021). Van Leeuwenhoek је 1684. године запазио микроорганизме на површини зубне глеђи, што би се могло сматрати првим открићем биофилма, али је проучавање биофилмова почело тридесетих година XIX века (Milanov et al., 2008; Ćabarkara, 2015; Vestby et al., 2020; Goswami et al., 2023). Са развојем електронске микроскопије почињу истраживања у овој области (Goswami et al., 2023), која су се у почетку углавном фокусирали на природне водене екосистеме, системе дистрибуције воде, третмане отпадних вода и денталне плакове (Milanov et al., 2008).

Биофилмови су заједнице микроорганизама које су иреверзибилно везане за површину, уклопљене у матрикс екстрацелуларне полимерне супстанце и које показују измењени фенотип у односу на брзину раста и транскрипцију гена (Donlan & Costerton, 2002; Milanov et al., 2008; Vestby et al., 2020; Alotaibi & Bukhari, 2021; Goswami et al., 2023). Настају на граници између две средине, најчешће су то ваздух и вода и расту на бројним абиотичким и биотичким површинама (Scheie & Petersen, 2004; Ivanović & Vučetić, 2006). Могу се формирати на површини меких ткива у организму (Alotaibi & Bukhari, 2021), биљкама, минералним површинама, стенама у слатким и сланим водама, нафтним цевима (Milanov et al., 2008; Vraneš & Leskovar, 2009), медицинским уређајима попут катететера, медицинских имплантата, контактних сочива, интраокуларних сочива, материјала за ушивање рана и другим помоћним медицинским средствима (Milanov et al., 2008; Bjarnsholt, 2013; Preda & Săndulescu, 2019; Guerra et al., 2022).

Бактерије у биофилму разликују се од својих планктонских еквивалената и ова два животна облика представљају два различита бактеријска фенотипа (Milanov et al., 2008; Khatoon et al., 2018; Goswami et al., 2023). Планктонске бактерије имају хидрофилну површину и када расту у култури показују експоненцијалну криву раста зависно од количине доступних хранљивих материја. Ове ћелије не поседују гликокаликс као заштитни слој и због тога су осетљивије на антибиотике и имунски систем домаћина (Šmitran, 2013). Са друге стране, бактерије у биофилму су екстраћелијским матриксом (ЕТМ) заштићене од имуног система домаћина и од дејства антибиотика (Khatoon et al., 2018; Mishra et al., 2023). Планктонски облик бактерија има брз одговор на факторе средине и потпуно другачију експресију гена у односу на сесилан

раст бактерија у биофилму (Rossi et al., 2016; Alotaibi & Bukhari, 2021). Генска експресија разликује се у биофилмовима и планктонским ћелијама, где чак 1% гена показује диференцијалну експресију, међу којима су гени који кодирају факторе вируленције и резистенцију на антибиотике (Zhang et al., 2013). Бактерије као одговор на неповољне услове средине, стрес или недовољну количину хранљивих материја могу да пређу у сесилни начин раста односно да формирају биофилм (Šmitran, 2013; Khatoon et al., 2018; Alotaibi & Bukhari, 2021).

Биофилмови могу да буду састављени од једне бактеријске врсте или заједнице неколико врста (Guerra et al., 2022). Популације у биофилму функционишу као кооперативне заједнице и развијају се по обрасцима вишећелијског понашања, где су због ограничене количине хранљивих материја, раст и размножавање бактерија успорени (Ivanović & Vučetić, 2006; Šmitran, 2013; Alotaibi & Bukhari, 2021).

Биофилм чине микроорганизми и екстраћелијски матрикс (Khatoon et al., 2018; Mishra et al., 2023). ЕЋМ је тродимензионално поље које окружује и причвршћује за површину везане бактерије и представља најважнији део биофилма (Šmitran, 2013; Mishra et al., 2023). Садржи 85-97% воде, полисахариде, протеине, фосфолипиде, тејхојну и нуклеинске киселине, као и друге полимере (Donlan, 2002; Preda & Săndulescu, 2019; Seder et al., 2022; Mishra et al., 2023). Већину матрикса биофилма чине шећери: глукоза, галактоза, маноза, фруктоза, рамноза и N-ацетилглукозамин (Donlan, 2002). Матрикс је прожет воденим каналима који служе за транспорт хранљивих материја и кисеоника, али се преко ових канала избацују и продукти метаболизма из биофилма (Khatoon et al., 2018; Alotaibi, 2021; Guerra et al., 2022). Матрикс представља заштиту бактерија од промена рН средине, УВ зрачења, оксидативног и осмотског шока (Preda & Săndulescu, 2019). Захваљујући биофилму бактерије задржавају влажност, што је посебно важно у воденој средини која је подложна повременом исушивању (Šmitran, 2013). Такође, ЕЋМ обезбеђује заштиту ћелија у биофилму од претњи као што су биоциди, антибиотици, антитела, детерџенти, бактериофаги или предатори као што су слободно-живеће амебе и фагоцитне ћелије имуног система (Milanov et al., 2008; Mishra et al., 2023).

Пре сазнања о постојању, структури и карактеристикама биофилма, биотехнолози су већ користили предности биофилма у погонима за пречишћавање вода при уклањању опасних супстанци које су контаминирале земљу и подземне воде (Valenzuela et al., 2006). Међутим, позитивна деловања биофилма су далеко ређа од штетних која узрокују огромне економске губитке у пољопривреди и индустрији (Vraneš

& Leskovar, 2009), као и многобројне проблеме у медицини (Vestby et al., 2020; Goswami et al., 2023).

Инфекције изазване бактеријама које продукују биофилм данас су један од најактуелнијих проблема у бактериологији, јер биофилмови доприносе патогенези и хроничном карактеру инфекција (Vjarnsholt, 2013; Vestby et al., 2020; Goswami et al., 2023). Биофилмови имају улогу у настанку око 80% бактеријских инфекција (Hou et al., 2012; Guerra et al., 2022; Fernández-Billón et al., 2023; Mishra et al., 2023; Ye et al., 2022). Антибиотска терапија елиминира само планктонске ћелије, док сесилни облици преживљавају, шире се у биофилму и настављају да се размножавају после завршене терапије. Високе концентрације антибиотика потребне за терапију ових инфекција могу бити токсичне за домаћина, па су због тога терапије углавном неуспешне, а инфекције хроничног карактера (Ivanović & Vučetić, 2006). У циљу ефикаснијег лечења инфекција изазваних биофилмовима, битно је открити факторе и услове средине који доводе до њиховог настанка, као и агенсе који ће негативно деловати како на настанак, тако и на већ формиране биофилмове.

Pseudomonas aeruginosa, патоген који изазива велики број инфекција хроничног карактера је типичан продуцент биофилма. Ова врста може стварати биофилмове на различитим биотичким и абиотичким површинама, попут ткива или катетера (Miller & Ahearn, 1987; Fletcher et al., 1993; Vjarnsholt, 2013). Истраживања која су испитивала способност продукције биофилма овог патогена показује да велики проценат сојева продукује биофилм. Собан и сарадници (2009) показали су да 33,3% (20/60) узорак *P. aeruginosa* изолованих из особа оболелих од цистичне фиброзе формирају биофилм, док су Кádár и сарадници (2010) показали да од 60 клиничких изолата 23,3% сојева продукују биофилм. Са друге стране, Lima и сарадници (2018) су показали да чак 77,5% (31/40) тестираних клиничких изолата *P. aeruginosa* има способност продукције биофилма.

Истраживања на тему продукције биофилма врста рода *Klebsiella* показала су да око 40% сојева врсте *K. pneumoniae* изолованих из урина, спутума, крви и брисева рана има способност продукције биофилма. Око 63% изолата из узорка урина пацијената са катетером су били способни да продукују биофилм, док су сојеви изоловани из ендотрахеалних тубуса пацијената оболелих од пнеумоније повезане са механичком вентилацијом такође продуковали биофилм (Wu et al., 2011; Vuotto et al., 2014). Формирање биофилмова на катетерима омогућава бактеријама да избегну одбрану

домаћина и хидродинамичке силе протока урина (Warren, 2001). Утврђено је да 72,7% изолата *K. pneumoniae* изолованих са медицинских уређаја представљају биофилм-продукујуће сојеве (Dan et al., 2023).

1.3.1.1. Формирање биофилма

При формирању биофилма најпре настаје млади биофилм који временом сазрева, постаје стабилан и добија нове карактеристике. Формирање биофилма представља сложени процес који захтева колективно понашање и одиграва се у пет развојних фаза: фаза адхезије (I), фаза агрегације (II), фаза формирања микроколонија (III), фаза матурације и формирања зрелог биофилма (IV) и фаза дисперзије (V) (Preda & Săndulescu, 2019; Guerra et al., 2022). Формирање биофилма почиње кондиционирањем површине полимерима из водене средине, што омогућује адхезију микроорганизама и средине. Кондиционирани слој се формира на већини супстрата као резултат хемијске модификације површине, а микроорганизми не адхерирају за супстрат сами по себи, већ се придржавају за овај слој (Milanov et al., 2008; Vraneš & Leskovar, 2009; Percival et al., 2011; Čabarkapa, 2015).

Адхезија ћелија за подлогу је најважнији корак у формирању биофилма (Preda & Săndulescu, 2019; Alotaibi & Bukhari, 2021). Највећи значај адхезије је у припајању ћелије за површину, агрегацији блиско постављених бактерија, стварању сигнала за прелазак у колективни начин живота и добијање заштитног матричног омотача (Šmitran, 2013). Овај процес се одвија се кроз две фазе: примарна адхезија (фаза реверзибилног везивања, асоцијација између бактерије и површине) и секундарна адхезија (фаза иреверзибилног везивања). Први корак у формирању биофилма представља контакт микроорганизама и површине и то омогућава примарну бактеријску адхезију (Čabarkapa, 2015; Khatoon et al., 2018; Alotaibi & Bukhari, 2021). У процесу адхезије бактеријске ћелије и подлоге укључене су привлачне и одбојне силе. Јављају се Van der Waals-ове и електростатичке силе, јонске везе и хидрофобне интеракције зависно од растојања између подлоге и ћелије, што омогућује везивање (Khatoon et al., 2018; Alotaibi & Bukhari, 2021). Ова фаза адхезије назива се фазом спајања (*docking stage*) (Dunne, 2002; Alotaibi & Bukhari, 2021). У моменту када силе привлачења постану веће од сила одбијања, везивање за супстрат постаје иреверзибилно. Карактеристика

иреверзибилне адхезије је да ћелије постају непокретне (Ћабаркара, 2015; Khatoon et al., 2018).

На адхезију ћелија утичу физичко-хемијске особине саме подлоге на којој се биофилм ствара и карактеристике средине. Особине подлоге значајно утичу на превазилажење почетних одбојних сила између бактерије и супстрата и везивање ћелија за супстрат. Адхеренција ћелија је утолико боља што је подлога храпавија (Alotaibi & Bukhari, 2021). Хидрофобност такође утиче на везивање, а показано је и да се бактерије боље везују за неполарне хидрофобне површине (тефлон и пластика), него за хидрофилне материјале попут стакла и метала (Ћабаркара, 2015). Адхеренција ћелија је зависна и од количине хранљивих материја у средини (Alotaibi & Bukhari, 2021). Особине ћелије, присуство фимбрија, флагеле и продукције специфичних протеина такође утичу на адхезију (Donlan, 2002; Šmitran, 2013; Preda & Săndulescu, 2019; Alotaibi & Bukhari, 2021; Seder et al., 2022). Утврђено је да су флагеларна покретљивост и пили типа IV код *P. aeruginosa* неопходни за интеракцију са површином и колонизацију (O'Toole & Kolter, 1998).

Агрегација ћелија представља другу фазу адхезије, када веза између бактерија и супстрата током времена јача, а везивање ћелија постаје иреверзибилно. Ова друга фаза назива се још и „фазом закључавања“ (*locking phase*) (Dunne, 2002; Milanov et al., 2008). У овој фази долази до раста, размножавања и акумулација микророганизма и повећава се количина ЕТМ (Ћабаркара, 2015; Alotaibi & Bukhari, 2021).

Формирање микроколонија и матурација биофилма је фаза коју карактерише раст и деоба ћелија што доводе до вишеслојности структуре биофилма и стварања микроколонија (Preda & Săndulescu, 2019; Guerra et al., 2022; Seder et al., 2022). Биофилм сазрева и добија тродимензионалну структуру (Alotaibi & Bukhari, 2021; Guerra et al., 2022). Микроколоније најчешће имају изглед стубића или гљива, а свој максимални раст достижу у стадијуму матурације II (Vraneš & Leskovar, 2009). Даљи раст биофилма наставља се захваљујући истовременој адхезији нових планктонских ћелија и растом већ повезаних ћелија, као и продукцијом ЕТМ (Preda & Săndulescu, 2019; Mishra et al., 2023).

На раст биофилма утичу хранљиве материје као и њихов доток до ћелија и елиминација метаболитских продуката бактерија, доток кисеоника, рН и осмоларност (Milanov et al., 2008; Ћабаркара, 2015). Током сазревања биофилма долази до стварања канала који омогућују транспорт хранљивих материја, кисеоника али секундарних метаболита до свих делова биофилма (Preda & Săndulescu, 2019; Guerra et al., 2022). У почетној фази колонизације кисеоник није ограничавајући фактор, док у вишеслојном

биофилму место појединачних ћелија одређује физиолошки статус ћелије. Хранљиве материје и кисеоник лакше стижу до ћелија у горњим деловима биофилма и овај слој се лакше ослобађа отпадних продуката метаболизма. Физиолошки статус ових ћелија је сличан као код планктонских ћелија. У дубљим слојевима где је слабији доток кисеоника, бактерије такође настављају дисање, с тим што као акцептор електрона служе нитрат и друга неорганска једињења (Ћабаркара, 2015). Ћелијска комуникација такође игра кључну улогу у сазревању и развоју тродимензионалне структуре биофилма (Milanov et al., 2008; Preda & Săndulescu, 2019).

Фаза дисперзије је пети стадијум којим се завршава сазревање биофилма. У овој фази биофилм је створен и могу се мењати његов облик и величина (Tolker-Nielsen et al., 2000; Šmitran, 2013). Карактеристика зрелог биофилма је одвајање његових делова и отпуштање бактерија у спољашњу средину, чиме долази до колонизације нових удаљених површина и супстрата, ширења постојеће инфекције као и настанак системских инфекција (Preda & Săndulescu, 2019; Alotaibi & Bukhari, 2021; Guerra et al., 2022). Дисперзија бактерија настаје као одговор на промењене услове средине, услед недостатка хранљивих материја или због других неповољних утицаја средине (Preda & Săndulescu, 2019; Alotaibi & Bukhari, 2021; Mishra et al., 2023). Ћелије се издвајају у потрази за новим и бољим извором хранљивих материја (Vraneš & Leskovar, 2009). Утврђено је да ћелије *Pseudomonas aeruginosa* продукују ензим алгинат лиазу као адаптивни одговор на услове гладовања (Mishra et al., 2023). Овај ензим разграђује полисахарид биофилма алгинат и ћелије се ослобађају из биофилма (Alipour et al., 2009).

Ерозија, откидање, расејавање и абразија су начини дисперзије бактерија из биофилма (Ћабаркара, 2015; Alotaibi & Bukhari, 2021; Seder et al., 2022). Ерозија је откидање мањих фрагмената или појединачних ћелија биофилма. Откидање је одвајање већих комада биофилма током касних фаза формирања биофилма, а последица је недостатка кисеоника и хранљивих материја (Alotaibi & Bukhari, 2021; Seder et al., 2022). Расејавање је отпуштање великог броја појединачних ћелија или малих агрегата из унутрашњости биофилма (Seder et al., 2022). Откидање и ерозија су пасивни процеси док је расејавање активан. Абразија је губитак биофилма услед судара честица из околне течности која окружује биофилм (Ћабаркара, 2015; Kaplan, 2010).

1.3.1.2. Комуникација ћелија у биофилму

Формирање биофилма и одржавање вишећелијске заједнице омогућено је захваљујући међућелијској комуникацији бактеријских ћелија (Khatoun et al., 2018; Guerra et al., 2022; Mishra et al., 2023; Ѐрек, 2023). Комуникација ћелија посредована је малим сигналним молекулима који имају способност дифузије у ванћелијску средину (Guerra et al., 2022). Сигнални молекули накупљају се у ванћелијској средини и на тај начин омогућују свакој појединачној бактеријској ћелији процену ћелијске густине, односно укупног броја бактерија. Овај вид комуникације назива се детекција кворума односно енглески *quorum sensing* (QS) (Zhou et al., 2017; Goswami et al., 2023; Ѐрек, 2023). Уочена је позитивна корелација између формирања биофилма и продукције QS сигналних молекула (Ѐрек, 2023). Сигнални молекули код Грам-негативних бактерија су N-ацил хомосерински лактони (АХЛ), док су код Грам-позитивних бактерија то олигопептиди (Kalia et al., 2015; Chen et al., 2017; Preda & Săndulescu, 2019; Guerra et al., 2022; Mishra et al., 2023; Ѐрек, 2023). Ови молекули могу да варирају у дужини и структури код различитих врста бактерија. Када се постигне довољно висока концентрација сигналних молекула која се дешава при тачно одређеној, критичној густини ћелија, тада долази до активирања гена укључених у синтезу фактора вируленције или секундарних метаболита (Vraneš & Leskovar, 2009; Strateva & Mitov, 2011; Guerra et al., 2022). Познато је преко 300 гена укључених у QS (Kalia et al., 2015).

Ефлукс пумпе имају велики значај у QS, јер њихова инхибиција доводи до повећане концентрације сигналних молекула у ћелији и смањења њихове ванћелијске концентрације, што директно утиче на комуникацију ћелија, а самим тим и формирање биофилма (Lorusso et al., 2022).

QS такође има значај и у трансферу гена (Preda & Săndulescu, 2019), јер је прелазак ДНК из једне у другу ћелију могућ само када се ћелије налазе у непосредној близини. Осим тога, комуникација доприноси и продукцији фактора вируленције (Strateva & Mitov, 2011; Qin et al., 2022). Такође, QS омогућава разградњу комплексних једињења, која бактерије разлажу егзоензимима ван ћелије услед немогућности уноса истих у ћелију. Када је популација бактерија довољно бројна, тада ће се синтетисати довољно ензима неопходних за разлагање тако комплексне супстанце (Šmitran, 2013).

1.3.1.3. Механизми резистенције бактерија у биофилму

Познато је да биофилм представља начин одбране бактерија од деловања антибиотика и имуног система домаћина. Терапија инфекција изазваних биофилмом је углавном неуспешна због велике резистенције бактерија у биофилму (Guerra et al., 2022; Mah et al., 2003). Бактерије унутар биофилма су 10-1500 пута резистентније на деловање антимицробних лекова у поређењу са планктонским ћелијама (Vestby et al., 2020; Goswami et al., 2023), због чега је већина инфекција пореклом из биофилма хроничног карактера. Биофилмови су резистентни на антибиотике, дезинфекциона средства, али и имуни систем домаћина (Stepanović et al., 2007; Khatoon et al., 2018; Mishra et al., 2023). Планктонске ћелије које се ослобађају са површине биофилма као и ћелије у горњим слојевима биофилма осетљиве су на дејство антибиотика. Мали број ћелија биофилма је неосетљив на продужену изложеност и на више концентрације антимицробних лекова. Ове ћелије преживљавају терапију и називају се перзистери. Перзистери такође постоје у планктонским културама међутим њих имуни систем уништи и избаци. Са друге стране, у биофилму су ћелије перзистери заштићене ектополисахаридним матриксом, па им имуни систем не може нашкодити. Када престане терапија и смањи се концентрација лека перзистери су ти који обнављају биофилм, ослобађају се нове планктонске ћелије и симптоми болести се враћају (Vraneš & Leskovar, 2009).

Показано је да биофилм није само дифузиона баријера за антибиотике, већ да у тој заједници бактерије покрећу различите механизме како би се одупрле деловању антибиотика (Lambert, 2002; Mah et al., 2003; Beaudoin et al., 2012; Zhang et al., 2013). Отпорност биофилмова на антибиотике је резултат комбинације различитих механизма који укључују спор пролазак антибиотика кроз биофилм, интеракција и инактивација антибиотика глуканима и компонентама матрикса и специфичне ефлукс пумпе (Zhang et al., 2013; Goswami et al., 2023; Fernández-Billón et al., 2023).

ЕћМ биофилма реагује као баријера која спречава продор антибиотика до дубљих слојева биофилма и представља један од механизма резистенције у биофилму (Goswami et al., 2023; Fernández-Billón et al., 2023). Везивање позитивних аминокликозида и негативних полимера матрикса и инактивирање антибиотика од стране компоненти матрикса, смањују продор ових агенаса у биофилм и представљају узрок смањене осетљивости бактерија у биофилму (Stewart, 2002). На пример, ампицилин може продрети кроз биофилм који формира β -лактамаза-негативан сој *K. pneumoniae*, али не може продрети кроз биофилм који формира лактамаза-позитивни

дивљи сој истог типа микроорганизама. Разлог овоме је деактивација антибиотика у горњим слојевима биофилма дивљег соја, која се дешава брже него што антибиотик продире кроз биофилм (Stewart & Costerton, 2001). Компоненте матрикса попут екстраћелијске ДНК (еДНК) могу да се вежу за позитивно наелектрисане антибиотике попут тобрамицина и да смање његову активност, док неутрални антибиотици попут ципрофлоксацина могу лакше да продру кроз матрикс (Fernández-Billón et al., 2023).

Међућелијска комуникација је још један од фактора који су одговорни за резистенцију биофилмова на антибиотике јер ћелије једна другу упозоравају на деловање антибиотика (Vraneš & Leskovar, 2009; Goswami et al., 2023; Başkan et al., 2023). Осим тога уочена је веза између продукције QS сигнала и резистенције на антибиотике (Mohamed et al., 2023).

Трансфер гена је још једна карактеристика која одликује биофилмове и доприноси заштити ћелија у заједници и повећаној резистенцији заједнице (Goswami et al., 2023; Fernández-Billón et al., 2023). Whiteley и сарадници (2001) су користећи ДНК микрочипове показали да биофилмови *P. aeruginosa* третирани тобрамицином могу да транскрибују гене за ефлукс пумпе. Антибиотска осетљивост се брзо враћа код бактерија које су расуте из биофилма. Брз повратак осетљивости указује да је резистенција последица адаптивног механизма, а не генетске промене. Биофилм омогућује настанак мутаната јер блискост међу ћелијама у биофилму убрзава трансфер плазида (Stewart, 2002).

Ограничење нутријената такође представља механизам који доводи до мање осетљивости ћелија на антибиотике (Goswami et al., 2023; Fernández-Billón et al., 2023). Познато је да у условима смањене количине хранљивих материја биофилм престаје са растом (Alotaibi & Bukhari, 2021). Такође је примећено да осетљивост ћелија на антибиотике расте са стопом раста биофилма, па успорен раст штити ћелије биофилма од деловања антибиотика (Goswami et al., 2023; Fernández-Billón et al., 2023).

1.3.1.4. Формирање и резистенција биофилма код *P. aeruginosa*

QS систем одговоран је за експресију фактора вируленције, формирање биофилма, покретљивост и резистенцију на антибиотике код соја *P. aeruginosa* (Ye et al., 2022). Код *P. aeruginosa* постоје два типа quorum sensing (QS) система, rhlI-rhlR и lasI-lasR системи, који обезбеђују комуникацију ћелија, утичу на формирање биофилма и

регулишу експресију осталих фактора вируленције (Rasamiravaka et al., 2015; Chen et al., 2017; Bařkan et al., 2023; Mohamed et al., 2023). *LasI* и *rhlI* су гени неопходни за синтезу сигналних молекула, *N*-(3-оксододеканоил)-*L*-хомосеринских лактона (ОдДХЛ) и *N*-бутаноил-*L*-хомосеринских лактона (БХЛ) (Chen et al., 2017; Bařkan et al., 2023). Ови молекули дифундују у ванћелијску средину. Са повећањем густине ћелија повећава се и концентрација сигналних молекула. Када пређу одређени праг концентрације, сигнални молекули везују се и активирају рецепторе *LasR* и *RhlR*, који даље регулишу експресију гена укључених у синтезу биофилма и кодирање осталих фактора вируленције (Kipnis & Sawa, 2006; Davies et al., 2012; Bařkan et al., 2023). *LasR* се везује за аутоиндуцер 3-охо-С12-HSL, док се *RhlR* везује за С4-HSL (Bařkan et al., 2023). Ген *las* је одговоран за кворум комуникацију и утиче на формирање биофилма код *P. aeruginosa* (Hentzer et al., 2003). *LasR* је регулаторни протеин који регулише експресију еластазе *LasB*, продукцију токсина (Husain et al., 2013) и формирање биофилма (Mohamed et al., 2023), док је *RhlR* регулаторни протеин укључен у продукцију пиоцијанина (Husain et al., 2013; Mohamed et al., 2023). Веза између формирања биофилма и QS огледа се у контроли мобилности ћелија. Покрети ројења (енгл. Swarming) регулисани су *rhl* системом и јављају се у раној формацији биофилма, док су покрети трзања (енгл. Twitching), који зависе од грчења и опружања пила типа IV такође регулисани *rhl* системом и неопходни су за повезивање ћелија у микроколоније (Rasamiravaka et al., 2015).

Осим ових АХЛ сигналних молекула, код *P. aeruginosa* могу се наћи и квинолони, група бактериоцина, који такође учествују у ћелијској комуникацији. Овај сигнални систем назван је PQS (енгл. *Pseudomonas quinolone signals*) (Chen et al., 2017; Bařkan et al., 2023; de Sousa et al., 2023). Показано је да су PQS молекули сличне структуре као и антибиотици, а учествују у ћелијској комуникацији иако не припадају групи АХЛ сигналних молекула и нису кодирани истим генима. Међутим, имају карактеристике сигналних молекула, где њихова концентрација зависи од густине ћелија, мали су дифундујући молекули и окидач су за специфични транскрипцијски одговор. Као одговор на PQS ћелије продукују фенозине, токсична хетероциклична једињења. Ова три сигнална система су временски организована, АХЛ молекули се стварају у раној фази, а квинолони у експоненцијалној фази раста културе (Dietrich et al., 2006).

Формирање биофилма представља сложен процес који осим комуникације ћелија захтева различите компоненте неопходне приликом иницијалног везивања ћелија за површину и формирања матрикса биофилма. Међу таквим компонентама налазе се еДНК, егзополисахариди (*Psl*, *Pel* и аглинат), пиовердин, рамнолипиди, лектини и

површински протеински додаци као што су флагеле и пили типа IV (Hou et al., 2012; Rasamiravaka et al., 2015; Qin et al., 2022).

Егзополисахариди Psl, Pel и аглинат су одговорни за формирање и стабилност биофилма (Qin et al., 2022; Seder et al., 2022). Главну улогу у иницијалном формирању биофилма *P. aeruginosa* има група *psl* гена (Hou et al., 2012; Seder et al., 2022). *PslA* ген је први из групе *psl* гена који обавља важну улогу у формирању биофилма (W. Hou et al., 2012). Psl полисахарид обезбеђује структуру биофилма физичком интеракцијом са еДНК (Seder et al., 2022). Pel полисахарид је глави чинилац матрикса биофилма *P. aeruginosa* и богат је глукозом (Colvin et al., 2011; Seder et al., 2022). Psl полисахарид састоји се од D-манозе, L-рамнозе и D-глукозе. Ови полисахариди су укључени у рану фазу формирања биофилма (Byrd et al., 2009).

Аглинат је линеарни полимер састављен од D-мануронске киселине и L-глукуронске киселине (Franklin et al., 2011). Има неколико улога у биофилму, доприноси структурној стабилности и заштити биофилма, задржавању воде и нутријената, као и антибиотској резистенцији (Franklin et al., 2011; Seder et al., 2022). Углавном га производе сојеви изоловани из пацијента са цистичном фиброзом (Seder et al., 2022; Edward et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Ген *algC* контролише ензим фосфоманомутаза који је укључен у синтезу овог егзополисахарида, неопходног за почетну фазу стварања биофилма. *Pseudomonas aeruginosa* активира *algC* ген до минута након адхезије за чврсту површину, а транскрипција овог гена у биофилму (у поређењу са планктонским ћелијама) је у просеку четири пута већа (Milanov et al., 2008).

еДНК је саставни део матрикса биофилма, а неопходна је за адхеренцију ћелија и рану фазу развоја биофилмова (Seder et al., 2022; Rasamiravaka et al., 2015). Основна функција еДНК је повезивање ћелија у стабилнију структуру, јер су биофилмови код којих недостаје еДНК осетљивији на детерцент натријум додецил сулфат (Rasamiravaka et al., 2015). Такође, еДНК има битну улогу у антибиотској резистенцији (Seder et al., 2022).

Лектини LecA и LecB доприносе развоју биофилма, а њихова експресија контролисана је *rhl* системом. Мутанти за ове лектине стварају тањи биофилм у односу на дивље сојеве (Rasamiravaka et al., 2015). Осим што су компоненте матрикса биофилма, лектини представљају и цитотоксичне факторе вируленције (Edward et al., 2023).

Површински ћелијски додаци, пили типа IV и флагеле су такође компоненте матрикса биофилмова. Флагеле се понашају као адхезини и омогућују иницијално везивање ћелија за површину, док пили типа IV омогућују стварање печуркастих

структура биофилма (Seder et al., 2022). Мутанти којима недостају флагеле и пили типа IV не стварају микроколоније (O'Toole & Kolter, 1998).

Глукани и ефлукс пумпе су главни механизми резистенције на антибиотике код *P. aeruginosa* (Seder et al., 2022). Код *Pseudomonas aeruginosa* UCSPP-PA14 идентификована су три гена (*ndvB*, *PA1875–1877* и *tssC1*) која нису укључена у формирање биофилма, али су значајни за специфичну биофилм резистенцију на антибиотике (Zhang et al., 2013). Ген *ndvB* кодира глукозилтрансферазу која неопходна за формирање цикличних периплазматичних глукана (Mah et al., 2003; Beaudoin et al., 2012), који интерагују са антибиотцима и удаљавају их од њиховог таргет места. Експресија овог гена већа је у биофилмовима у односу на планктонске ћелије. Инактивирање *ndvB* гена не доводи до промена у развоју и структури биофилма, али се повећава осетљивост биофилма на аминогликозиде тобрамицин, гентамицин и ципрофлоксацин (Mah et al., 2003; Beaudoin et al., 2012). *PA1875–1877* је део оперона који кодира ефлукс пумпе, које даље избацују антибиотике из ћелија које расту у биофилму. *TssC1* је компонента секреторионе система типа VI код *P. aeruginosa*, укљученог у резистенцију биофилмова, чији механизам деловања није потпуно познат (Zhang et al., 2013).

Код *P. aeruginosa* позната су четири оперона којима се регулишу ефлукс пумпе, *mexAB-oprM*, *mexXY-oprM*, *mexCD-oprJ* и *mexEF-oprN10* (Lambert, 2002). Ове пумпе могу да избаце све класе антибиотика осим полимиксина. Ефлукс пумпа *MexAB-oprM* избацује β -лактамске антибиотике, кинолоне, тетрациклине, линкомицин, хлорамфеникол, новобиоцин и нека средства за дезинфекцију. *MexCD-OprJ* је повезана са резистенцијом на ципрофлоксацин, цефепим и хлорамфеникол, док *mexXY-oprM* избацује аминогликозиде и флуорокинолоне, а *mexEF-oprN* карбапенеме (Lambert, 2002; Lorusso et al., 2022; Qin et al., 2022; Seder et al., 2022). Оперони који стварају ове продукте постоје код свих сојева, али ниво експресије није увек висок. Повећана експресија може бити резултат мутације неког регулаторног гена, као на пример гена *mexR* који контролише експресију *mexAB-oprM* оперона (Lambert, 2002).

1.3.1.5. Формирање и резистенција биофилма код врсте рода *Klebsiella*

Формирању биофилма код врсте рода *Klebsiella* доприносе фактори попут капсуле, продукције полисахарида, присуства пила и фимбрија, али и метаболизам гвожђа (Guerra et al., 2022). Присуство капсула помаже формирању биофилма, посебно у фази везивања ћелија за површину и сазревању, док сојеви без капсула не могу да продукују биофилм (Zheng et al., 2018). Сојеви код којих је уочено одсуство гена за производњу липополисахарида такође нису продуковали биофилм (Vuotto et al., 2017). Фимбрије као адхезини промовишу везивање ћелија за површину и на тај начин доприносе формирању биофилма (Guerra et al., 2022).

Познато је да Грам негативне бактерије продукују два типа АХЛ молекула, АИ-1 и АИ-2 аутоиндуцере. Бактерије рода *Klebsiella* немају *luxI* гене у свом геному и не продукују АИ-1 молекуле. Ови сојеви са друге стране кодирају SdiA и LuxR тип рецепторе, који представљају рецепторе за АХЛ молекуле бактерија других врста (Pacheco et al., 2021; Guerra et al., 2022). Мутанти за *sdiA* ген имају повећану формацију биофилма за разлику од дивљих сојева. Резултати су показали да SdiA реагује са АХЛ молекулима других врста и смањује продукцију биофилма код соја *K. pneumoniae* (Pacheco et al., 2021). Са друге стране, QS комуникација везана за регулацију биофилма код врста рода *Klebsiella* одвија се ослобађањем АИ-2 аутоиндуцера (тип 2 QS-регулаторни молекули) ван ћелије. АИ-2 су кодирани *luxS* геном, имају улогу регулатора формирања биофилма и учествују у синтези липополисахарида (De Araujo et al., 2010; Guerra et al., 2022). Истраживања показују да ови сигнални молекули имају улогу у почетној фази формирања биофилма (Pacheco et al., 2021; Guerra et al., 2022).

Први корак у инфективном процесу бактерија је везивање микроорганизама за површину ћелија домаћина, односно адхеренција ћелија, коју код рода *Klebsiella* обезбеђују фимбрије (Guerra et al., 2022). Фимбрије су нефлагеларни, филаментозни израштаји на површини бактерија, дужине до 10 μm са пречником од 1 до 11 nm. Постоје два типа фимбрија тип 1 и тип 3. Састоје се од полимерних глобуларних протеинских субјединица са моларном масом од 15-26 kDa. Разликују на основу њихове способности да аглутинирају еритроците различитих животињских врста. У зависности од тога да ли је реакција инхибирана D-манозом, ови адхезини су означени као маноза-сензитивни или маноза-резистентни хемаглутинини (МСХА и МРХА) (Martin & Bachman, 2018). Фимбрије доприносе вирулентности врста овог рода и кодирани су *fim* и *mrk* генским групама (Li et al., 2014; Guerra et al., 2022).

Код соја *K. pneumoniae* фимбрије типа 1 кодиране су *fimA* геном који одређује структуру фимбрија, док *fimC* утиче на адхезивна својства фимбрија. Фимбрије типа 1 имају афинитет према остацима манозе и због тога се овај тип везивања назива и маноза сензитивно везивање (Paczosa & Mecsas, 2016; Guerra et al., 2022). *fimH* ген је одговоран за везивање фимбрија за остатке манозе (Stahlhut et al., 2012). Овај тип фимбрија има главну улогу у настанку уринарних инфекција, јер се на површини епителних ћелија бешике налазе остаци манозе, за које адхерирају фимбрије и доводе до стварања заједница сличних биофилму (Pacheco et al., 2021). Тачна улога овог типа фимбрија у формирању биофилма још увек није позната (Paczosa & Mecsas, 2016), али се сматра да нису неопходне за почетну фазу формирање биофилма (Schroll et al., 2010; Guerra et al., 2022).

Присуство фимбрија типа 3 захтева присуство најмање 6 *mrk* gena (Pacheco et al., 2021). Истраживања су показале да су од 44 испитиваних соја рода *Klebsiella*, 10 изолата *K. oxytoca* и 6 изолата *K. pneumoniae* поседовали *mrkD* ген и имали присутне фимбрије типа 3 (Sebghati et al., 1998). Ген *mrkA* кодира главну фимбријску субјединицу, а *mrkD* кодира фимбријални адхезин одговоран за маноза-резистентну хемаглутинацију (Struve et al., 2009). Продукти *mrkB*, *C* и *E* укључени су у регулацију и структуру фимбрија, док је *mrkF* укључен у површинску стабилност овог типа фимбрија. Овај тип фимбрија није сензитиван и не везује манозу (Paczosa & Mecsas, 2016), али је неопходан у формирању биофилма на абиотичким површинама (Li et al., 2014; Ashwath et al., 2022). Показано је да се фимбрије не јављају у планктонској форми, а током формирања биофилма на катетерима долази до експресије фимбрија типа 3 (Ashwath et al., 2022; Guerra et al., 2022).

Klebsiella pneumoniae има способност регулације експресије типа фимбрија зависно од услова средине (Guerra et al., 2022). Истраживања су показала да су гени одговорни за продукцију фимбрија типа 1 активни када се бактерије нађу у уринарном тракту, али не и у плућима и гастроинтестиналном тракту (Schroll et al., 2010; Paczosa and Mecsasb, 2016; Riwu et al., 2022). Са друге стране улога фимбрија типа 3 у инфекцији ових органа није потпуно јасна, али је познато да немају улогу у инфекцији уринарног тракта (Struve et al., 2009; Schroll et al., 2010).

Показана је позитивна корелација у присуству гена *wcaG* који је укључен у формирање капсула и продукције биофилма (Zheng et al., 2018). Гени који регулишу синтезу капсула *wza* и *ORF14* такође су битни у раној фази формирања биофилма (Wu et al., 2011). Формирању биофилма доприносе фимбрије типа 3, док је показано да је

експресија фимбрија типа 1 нижа и овај тип фимбрија нема значаја при формирању биофилма (Schroll et al., 2010).

Као и код сојева *P. aeruginosa*, резистенцији биофилма сојева рода *Klebsiella* доприносе ефлукс пумпе избацујући антибиотике из бактеријске ћелије. Једна од ових пумпи је AcrAB која утиче на вируленцију и резистенцију соја *K. pneumoniae* (Martin & Bachman, 2018).

1.3.2. Покретљивост *Pseudomonas aeruginosa*

Патогености бактерије *P. aeruginosa* у великој мери доприносе различити видови покретљивости. Покретљивост бактерија има кључну улогу у бактеријској колонизацији површина и ширењу бактерија али и у формирању биофилмова (de Sousa et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Сој *P. aeruginosa* поседује два типа површинских органела, одговорних за покретљивост бактерије, а то су пили типа IV и поларна флагела (Shao et al., 2022; de Sousa et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). *Pseudomonas aeruginosa* може формирати покрете пливања уз помоћ флагеле или покрете ројења и клизања (трзања) по површини захваљујући комбинацији флагела и пила типа IV (Köhler et al., 2000; Khan et al., 2020; de Sousa et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Постоје две подфамилије пила типа IV, а то су пили типа IVa и IVb. Пили типа IVa састоје се углавном од субједница протеина PilA, а покрећу се захваљујући протеину PilT. Пили типа IVb састоје се од субјединица протеина Flp и ови пили се не контрахују, па су углавном укључени у адхеренцију ћелија за површину (de Sousa et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Тип покрета се може детектовати swimming, swarming и twitching експериментима (Overhage et al., 2007).

Покрети пливања (swimming) представљају кретање бактерија које је омогућено брзим покретима флагеле у течној средини (Khan et al., 2020; de Sousa et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Ови покрети не захтевају међусобну ћелијску комуникацију и не зависе од густине ћелија (Rashid & Kornberg, 2000). За покретање флагеле неопходно је присуство полифосфатне киназе (ППК), ензима који катализује реакцију разградње аденозин трифосфата на аденозин дифосфат и неоргански фосфат, којом се обезбеђује енергија за покрете (Rashid & Kornberg, 2000).

На полуврстим подлогама у присуству извора азота и угљеника, развијају се покрети ројења (swarming) (Murray & Kazmierczak, 2008). Покрети ројења зависе од

густине бактеријских ћелија (Köhler et al., 2000; Copeland & Weibel, 2009), присуства нутријената за раст и влажности подлоге (Köhler et al., 2000). Овај тип покрета представља брзо вишећелијско кретање по површини и одликује се разноликим фенотипом (Kearns, 2011), а одвија се комбинованим учешћем флагела и пила типа IVa (Sánchez-Jiménez et al., 2023). Функционални липополисахарид (ЛПС) је такође неопходан за покрете ројења (Lindhout et al., 2009). Сојеви који расту у условима погодним за формирање овог типа покрета (подлога са сукцинатом и глутаматом као извором угљеника), формирају равне, униформне биофилмове, док сојеви са ограниченим покретима ројења формирају биофилмове са неконфлуентним ћелијским агрегатима (Rasamiravaka et al., 2015).

Покрети трзања (twitching) развијају се на чврстим подлогама и за њих су одговорни издуживање и скраћивање пила типа IVa (Darzins, 1994; de Sousa et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023). Сојеви који показују покрете овог типа имају колоније неправилних ивица, што је последица издуживања пила типа IV. Мутанти којима недостају пили типа IV стварају колоније са глатким ивицама (O'Toole & Kolter, 1998).

Покретљивост овог соја представља фактор вируленције (Khan et al., 2020) али је неопходна и за стварање биофилма на абиотичким и биотичким површинама (Sánchez-Jiménez et al., 2023; Ye et al., 2022). Флагеле и пили имају битне улоге у различитим фазама инфекције. Пили типа IV одговорни су за адхеренцију бактеријских ћелија за еукариотску површину и формирање биофилма (Darzins, 1994; O'Toole & Kolter, 1998).

Одсуство неких од покрета може бити због абнормалне функције флагела или пила, или недостатака у преносу сигнала. Потенцијална корист којој доприноси покретљивост бактерија представља боље искоришћавање нутријената, избегавање токсичних супстанци, могућност ширења на домаћине, ширење у окружењу (Rashid & Kornberg, 2000).

1.3.3. Пиоцијанин

Како би избегао имуни одговор домаћина, *Pseudomonas aeruginosa* ствара различите егзопродукте: еластазе, алкалне протеазе, LasA протеазе, хемолизин, рамнолипиде и пиоцијанин (Stanković Nedeljković et al., 2011; Edward et al., 2023; Sánchez-Jiménez et al., 2023).

Пиоцијанин је плавичасто-зелени пигмент, који је по хемијском саставу дериват феназина (El-Fouly et al., 2015; Abdul-Hussein & Atia, 2016; Seder et al., 2022; Shao et al., 2022) и који представља један од кључних фактора хроничних инфекција (Shao et al., 2022). Продукција пиоцијанина регулисана је QS системом (Cao et al., 2001; Shao et al., 2022). Ово једињење служи као ћелијски трансмитер који учествује у регулацији експресије гена (Stanković Nedeljković et al., 2011). Пиоцијанин је токсичан за респираторни епител и делује на структуру ћелија и функцију његових трепљи, а поред ове утврђено је да ово једињење поседује различите биолошке активности и то антимицробну, антифунгалну (Ozdal, 2019; Abdul-Hussein & Atia, 2016), антитуморску, антималаријску, антипаразитску, имуносупресивну и антиоксидативну (Ozdal, 2019). Продукција овог пигмента зависи од услова средине, иззора угљеника и азота, доступности кисеоника, концентрација соли, температуре и рН средине (Ozdal, 2019; Patil et al., 2017).

1.3.4. Капсуле

Представници рода *Klebsiella* обично поседују капсуле, полисахаридни матрикс који обавија ћелију и представља кључни фактор вируленције овог рода (Paczosa & Mecsas, 2016; Guerra et al., 2022). Капсуле су изграђене од сложених киселих полисахарида. Понављајуће субјединице се састоје од 4-6 шећера и уронске киселине (као негативно наелектрисане компоненте) (Podschun & Ullmann, 1998).

Примарна улога капсула је заштита бактерије од фагоцитозе и бактерицидних средстава. Поред тога што штите од фагоцитозе, полисахариди капсуле инхибирају диференцијацију и функционални капацитет макрофага у *in vitro* условима (Martin & Bachman, 2018).

Капсуле се састоје од специфичних капсуларних полисахарида (CPS) названих К антигени (детектовано је 78 различитих антигена (K1 до K78) и типова капсуле) (Martin & Bachman, 2018; Riwi et al., 2022). Откривено је да постоје велике разлике у вируленцији које зависе од типова капсуле, односно њених антигена (Pan et al., 2008; Martin & Bachman, 2018). Степен вируленције коју даје одређени К антиген може бити повезан са садржајем манозе у капсуларним полисахаридима. Капсуларни типови са ниском вируленцијом као што су сојеви са K7 или K21 антигеном садрже репетитивне секвенце манозе- α -2/3-манозе или L-рамнозе- α -2/3-L-рамнозе. Ове секвенце препознаје

лектин који се налази на површини макрофага и који омогућава опсонин-независну фагоцитозу која је позната и као лектинофагоцитоза (Kabha et al., 1995).

Гени укључени у продукцију капсула (*wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gnd*, *wca*, *cpsB*, *cpsG*, и *galF*) налазе се на хромозомалном оперону *cps* (Riwu et al., 2022). *Wzi* ген је повезан са специфичним К антигенима и кодира површински протеин који има улогу у повезивању капсула са спољашњом мембраном. На значај овог протеина указује и чињеница да његов губитак резултира у појави бактеријских ћелија без капсуле. Овај ген укључен је у полимеризацију капсуларних полисахарида, док су *wza* и *wzc* одговорни за површинско повезивање ових полисахарида. Полимере капсула кодирају и *cpsB* и *cpsG* (Paczosa & Mecsas, 2016; Martin & Bachman, 2018). Осим што имају улогу у формирању биофилма, полисахариди капсула показују и антибиофилм особине на друге бактеријске врсте и на овај начин омогућују предност у мешовитим биофилмовима (Guerra et al., 2022).

1.4. Етарска уља

Биљни производи су се током читаве људске историје користили као лекови и представљају примарни извор здравствене заштите за око 70% људске популације (David et al., 2015). Секундарни метаболити биљака представљају структурно веома различите компоненте са великим бројем биолошких активности. На структурну разноликост секундарних биљних метаболита указује и податак да је познато преко 12000 алкалоида, 8000 фенолних једињења и 25000 терпеноида (Radulović et al., 2013). Због тога биљни производи представљају резервоаре за развој лекова. Синтетички антибиотици су и те како допринели смањењу заразних болести, међутим последњих година све је учесталија појава бактеријских инфекција које се јављају као последица развоја резистенције на постојеће лекове. Резистенција је природни еволуциони феномен где микроорганизми различитим адаптивним механизмима развијају резистенцију на често коришћене антибиотике и антимицробне лекове. Због све већег броја микроорганизма који развијају резистенцију, Светска здравствена организација ставила је овај проблем међу првих десет највећих претњи 2019. године (Yu et al., 2020). Због тога је неопходно пронаћи антимицробне супстанце које ће повећати потенцијал постојећих лекова и антибиотика и тиме помоћи у превазилажењу бактеријске резистенције. Ово је навело научнике да решење овог проблема потраже међу биљним производима.

Етарска уља представљају смеше испарљивих једињења која настају као продукт секундарног метаболизма биљака (Sousa et al., 2022; Jažo et al., 2023). По хемијском саставу могу бити смеше две различите класе једињења: терпена (испарљиви моно-, ди- и сесквитерпени) и фенилпропанских деривата. Још од давнина је познато да етарска уља имају биолошку активност, антибактеријско, антиоксидативно и антитифунгално дејство (Varatta et al., 1998; Tariq et al., 2019; Sousa et al., 2022). Познато око 3000 врста етарских уља, од којих су 300 комерцијално значајна и користе се у козметици, фармаколошкој индустрији и индустрији хране (Brenes & Roura, 2010; Tariq et al., 2019; Nou et al., 2022). У односу на бактеријске ћелије, етарска уља могу имати инхибиторно дејство при коме се зауставља раст ћелија (бактериостатски ефекат) или могу смањити број ћелија (бактерицидни ефекат) (Tariq et al., 2019). Након неутрализације уља која имају бактериостатски ефекат, бактеријске ћелије се опорављају и настављају свој раст и деобу, док је бактерицидни ефекат инверзибилан, ћелије нису способне да се опораве и наставе раст и деобу већ је исход летални ефекат (смрт ћелије).

Еколошки фактори, фенофаза и време сакупљања хербе утичу на хемијски састав и антимикуробну активност уља (Marić et al., 2006; Hussain et al., 2008; Jelačić et al., 2011). Са друге стране испарљиве особине, као и растворљивост у води отежавају одређивање њихове антимикуробне активности. Антимикуробна активност етарских уља зависи како од хемијског састава уља тако и од интеракције између компоненти уља. Типови интеракција међу компонентама могу бити антагонистички, синергистички и адитивни (Tariq et al., 2019).

1.4.1. Етарска уља жалфије, босиљка и ртањског чаја

Salvia officinalis L. (жалфија) и *Ocimum basilicum* L. (босиљак) и *Satureja montana* L. (ртањски чај) су ароматичне биљке из породице Lamiaceae. Жалфија има лековито дејство и широку употребу у модерној и традиционалној медицини (Jažo et al., 2023) и поседује антимикуробно, антифунгално, антиинфламаторно и антиоксидативно дејство (Plić et al., 2023). Босиљак се такође користи у традиционалној медицини и то код главобоља, прехлада, болова у стомаку, надимања, дијареје и уринарних инфекција (Politeo et al., 2007; Elgndi et al., 2017). Ртањски чај се традиционално примарно користи као зачин и природни конзерванс али и у лечењу бронхитиса, као антисептик, олакшава варење, а истраживања су потврдила антиоксидативну, антибактеријску и антифунгалну

активност етарског уља ртањског чаја (Skočibušić & Bezić, 2004; Ćavar et al., 2008; Damjanović-Vratnica et al., 2011; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Ćavar et al., 2014; Trifan et al., 2015; Aćimović et al., 2022; Kulić et al., 2023).

Хемијски састав етарских уља жалфије може широко да варира што утиче на укус, мирис, али и билошку активност уља (Craft et al., 2017). Уља жалфије која садрже кариофилин у високом проценту карактеришу се веома оштрим и специфичним мирисом, као и ниском вискозношћу (Khalil & Li, 2011; Singh, 2013). Биолошки активни кетони и алкохоли у етарском уљу жалфије одговорни су за његову антимикуробну активност, укључујући и главне компоненте етарског уља α -тујон, β -тујон, камфор, 1, 8-синеол, борнеол, α -пинен, кариофилен, док α -тујони имају и токсичан ефекат (Delamare et al., 2007; Khalil & Li, 2011). Процент заступљености компоненти у уљу зависи од надморске висине (Marić et al., 2006; Khalil & Li, 2011; Jažo et al., 2023), делова биљке из којих се изолује уље и фазе развоја биљке (Marić et al., 2006; Lakušić et al., 2013) и методе дестилације (Veličković et al., 2012). На основу заступљености појединих компоненти уља жалфије могу се груписати у одређене хемотипове, па су тако Tucker и Maciarello (1990) описали пет главних хемотипова на основу заступљености доминантних компоненти: (тип 1) камфор > α -тујон > 1,8-синеол > β -тујон; (тип 2) камфор > α -тујон > β -тујон > 1,8-синеол; (тип 3) β -тујон > камфор > 1,8-синеол > α -тујон; (тип 4) 1,8-синеол > камфор > α -тујон > β -тујон; и (тип 5) α -тујон > камфор > β -тујон > 1,8-синеол. Jug-Dujaković и сарадници (2012) су описали три хемотипа (А) α -тујон > камфор > 1,8-синеол > β -тујон; (В) β -тујон > α -тујон > камфор \approx 1,8-синеол; (С) камфор > α -тујон > 1,8-синеол > камфен \approx борнеол. Lakušić и сарадници (2013) су такође дефинисали три хемотипа: тип I α -хумулен; тип IIа тујон; и тип IIб камфор. Craft и сарадници (2017) су дали нешто детаљнији преглед групације уља па су тако дефинисали пет хемотипова (Ц1) α -тујон/камфор, (Ц2) α -хумулен/ α -тујон, (Ц3) β -тујон/ α -тујон/камфор, (Ц4) 1,8-синеол/камфор и (Ц5) склареол/ α -тујон. Пошто на састав етарских уља утичу и климатски и остали еколошки фактори локације на којој су расле, хемотипови су карактеристични за различита подручја (Craft et al., 2017). Преглед досадашњих резултата испитивања хемијског састава уља жалфије пореклом из Србије и земаља региона дат је у Табели 3 и примећено је да највећи проценат уља припада α -тујон/камфор хемотипу (Couladis et al., 2002, Marić et al., 2006, Božin et al., 2007; Damjanović-Vratnica et al., 2008; Soković et al., 2010; Lakušić et al., 2013; Milenković et al., 2015; Radulović et al., 2017; Matković et al., 2018; Sarić-Krsmanović et al., 2019; Šojić et al., 2021; Štrbac et al., 2022; Aćimović et al., 2022; Gladikostić et al., 2023; Jažo et al., 2023; Plić et al., 2023).

Слика 1. Изглед биљке *Salvia officinalis*Табела 3. Садржај најзаступљенијих компоненти (%) етарског уља *Salvia officinalis* -
Преглед литературе

Земља порекла	Компоненте %	Референце
Србија	1,8-синеол (9,79); β -тујон (8,08); виридифлорол (7,89); камфор (6,03); α - тујон (4,88)	(Miladinović & Miladinović, 2000)
Србија	α -тујон (22,1); 1,8-синеол (16,2); α - хумулен (11); α -пинен (3,7)	(Veličković et al., 2002)
Црна Гора	Е1: α -тујон (16,2); α -хумулен (12,28); 1,8- синеол (12,07), виридифлорол (9,19); β - кариофилен (8,78); манол (6,96)	(Couladis et al., 2002)
	Е2: α -тујон (25,35); виридифлорол (26,1); α -хумулен (12,49); манол (8,37); 1,8- синеол (6,9)	
	Е3: α -тујон (17,07); камфор (16,54); 1,8- синеол (12,82); виридифлорол (11,67); манол (7,23); β -кариофилен (5,28)	
	Е4: 1,8-синеол (18,54); α -тујон (16,87); (12, 74); β -кариофилен (8,44); камфор (8,89); манол (7,01)	

	E5: камфор (17,83); виридифлорол (14,03); 1,8-синеол (11,91); α -тујон (11,35); α -хумулен (6,43); β -кариофилен (6,22); манол (6,85)	
	E6: 1,8-синеол (11,35); α -тујон (11,36); камфор (11,05); виридифлорол (10,81); β -кариофилен (9,41); борнеол (7,19); α -хумулен (8,58); манол (6,72)	
	E7: камфор (21,12); α -тујон (10,87); 1,8-синеол (11,01); виридифлорол (14,06); манол (9,14); α -хумулен (7,31)	
	E8: α -хумулен (11,07); виридифлорол (15,61); α тујон (15,82); 1,8-синеол (13,45); камфор (4,24)	
	E9: виридифлорол (15,32); манол (15,92); 1,8-синеол (12); α -тујон (8,47); борнеол (8,5); камфор (7,62)	
Србија	E1: α -тујон (19,54); 1,8-синеол (16,66); камфор (9,74); виридифлорол (9,59); α -хумулен (7,59); борнеол (5,7)	(Couladis et al., 2002)
	E2: камфор (24,8); α -тујон (19,9); 1,8-синеол (6,35); борнеол (5,4); виридифлорол (5,97)	
Румунија	α -тујон (21,85); камфор (11,25); виридифлорол (11,71); манол (9,15)	(Radulescu et al., 2004)
Србија	α -тујон (37,5); 1,8-синеол (14,4); камфор (13,7); α -пинен (5,05); α -хумулен (4,9)	(Mitić-Culafić et al., 2005)
Босна и Херцеговина	α -тујон (23,9); камфор (29,1); 1,8-синеол (9,6); виридифлорол (7, 8)	(Marić et al., 2006)
Хрватска	α -тујон (57); β -тујон (15); виридифлорол (14,2)	(Maksimović et al., 2007)
Босна и Херцеговина	α -тујон (21); 1,8-синеол (10,6); камфор (29,1); борнеол (5,1); виридифлорол (6)	(Maksimović et al., 2007)
Србија	α -тујон (19,9); камфор (18,9); виридифлорол (17, 4); борнеол (5,4)	(Božin et al., 2007)
Црна Гора	α -тујон (29,5); камфор (22,52); 1,8-синеол (12,03); борнеол (4,4); β -тујон (4,08)	(Damjanovic-Vratnica et al., 2008)
Србија	α -тујон (31,7); камфор (16,7); 1,8-синеол (8,7); камфен (6,9); α -пинен (4,8); β -тујон (4,6)	(Soković et al., 2010)
Хрватска	β -тујон (28,4); камфор (18,9); 1,8-синеол (11,8); камфен (9,9)	(Jug-Dujaković et al., 2012)
Србија	α -тујон (19,4); 1,8-синеол (16,4); α -хумулен (8,7); β -пинен (8,07)	(Veličković et al., 2012)
Србија	E1: α -хумулен (18,9); камфор (18); манол (14,5); виридифлорол (11,2); α -тујон (7); 1,8-синеол (6,9);	(Lakušić et al., 2013)

	E2: камфор (27,4); α -тујон (20); камфен (8,4); лимонен (7,4); виридифлорол (5,7); 1,8-синеол (5,1);	
Хрватска	E1: α -хумулен (33,3); α -тујон (10,6); виридифлорол (10,7); манол (9,2); 1,8-синеол (5,8) E2: α -тујон (28,5); камфор (16,4); виридифлорол (8,3); α -хумулен (6,7); манол (5,6);	(Lakušić et al., 2013)
Хрватска	E1: 1,8-синеол (19,4); α -тујон (16,5); камфор (10,7); β -пинен (6,5); E2: камфор (30,4); α -тујон (25,9); β -тујон (4,3)	(Milenković et al., 2015)
Србија	α -тујон (28,2); камфор (27, 5); 1,8-синеол (8,3); β -тујон (5,1); борнеол (5,8)	(Radulović et al., 2017)
Босна и херцеговина	β -тујон (32,7); камфор (17,2); 1,8-синеол (10,1); α -пинен (8,6); камфен (7,3);	(Matković et al., 2018)
Србија	α -тујон (20,8); камфор (20,8); виридифлор (14,1); 1,8-синеол (9,1); β -тујон (6,7); манол (5)	(Sarić-Krsmanović et al., 2019)
Србија	<i>cis</i> -тујон (27.1); камфор (19.3)	(Aćimović et al., 2019)
Србија	α -тујон (35,5); камфор (20,7); 1,8-синеол (12,13); β -тујон (6,57)	(Šojić et al., 2021)
Србија	камфен (21,6); α -пинен (23); α -тујон (13,9); камфор (8,1); 1,8-синеол (6,4)	(Kostić et al., 2022)
Србија	α -тујон (38,76); камфор (19,75); 1,8-синеол (8,40), камфен (5,36); α -хумулен (4,15)	(Štrbac et al., 2022)
Србија	виридифлорол (20,2); камфор (19,5); α -тујон (12,2); 1,8-синеол (6,9); борнеол (8,8)	(Đurović et al., 2022)
Србија	E1: α -тујон (29); камфор (17,7); β -тујон (12,3); 1,8-синеол (8,8); камфен (6,2); E2: α -тујон (21,7); камфор (19,6); β -тујон (13,2); 1,8-синеол (9,8); β -кариофилен (5,5); камфен (4,7); борнеол (4,8); E3: α -тујон (19,9); камфор (15,8); β -тујон (13,39); 1,8-синеол (11,3); β -кариофилен (4,2); борнеол (4)	(Aćimović et al., 2022)
Србија	камфор (26,48); α -тујон (25,8); 1,8-синеол (7,27); β -тујон (6,2); манол (8,07); камфен (5,33)	(Gladikostić et al., 2023)
Хрватска	E1: α -тујон (26,5) камфор (23,6); β -тујон (13,8); 1,8-синеол (8,1); виридифлорол (9,3) E2: α -тујон (32,5); камфор (12,4); β -тујон (9,5); 1,8-синеол (7,2); виридифлорол (6,4)	(Jažo et al., 2023)

	E3: α -тујон (42,6); камфор (12,4); виридифлорол (8,2); β -тујон (7,4); 1,8- синеол (4,2)	
	E4: α -тујон (25,3) камфор (22,1); β -тујон (12,2); 1,8-синеол (9,9); виридифлорол (5,3)	
	E5: α -тујон (27,3); камфор (18,2); 1,8- синеол (8,6); β -тујон (6,7); виридифлорол (5,2)	
	E7: α -тујон (33,1); камфор (13,3); 1,8- синеол (9,8); виридифлорол (8,5)	
	E8: α -тујон (12,6); камфор (33,3); 1,8- синеол (9,8); виридифлорол (7,7)	
Србија	E1: α -тујон (43,2); камфор (17, 6); 1,8- синеол (13,8); β -тујон (5,6); виридифлорол (3,8)	
	E2: камфор (31,5); α -тујон (23,5); β -тујон (9); 1,8-синеол (6,1)	(Ilić et al., 2023)
	E3: камфор (30, 9); α -тујон (28, 3); 1,8- синеол (11); β -тујон (4,4)	

У састав етарског уља босиљка улазе терпени и фенолна једињења. Хемијски састав етарског уља босиљка је варијабилан, па се тако међу компонентама са високим процентом могу наћи метил чавикол, еугенол, метил еугенол и гераниол, 1,8-синеол, камфор, линолол, α -терпинеол и тимол (Özcan & Chalchat, 2002; Pripdeevch et al., 2010; Wesolowska et al., 2012), за које је утврђено да испољавају антимикуробни ефекат (Park et al., 2012; Herman et al., 2016; Ilić et al., 2022). Процент заступљености компоненти у уљу зависи од еколошких услова у којима биљка расте (Ilić et al., 2022). Преглед досадашњих резултата испитивања хемијског састава уља босиљка пореклом из Србије и земаља региона дат је у Табели 4, где се уочава да је линалол у највећем броју истраживања најзаступљенија компонента (Soković et al., 2010; Politeo et al., 2007; Soković et al., 2010; Jelačić et al., 2011; Radulović et al., 2013; Beatović et al., 2015; Stanojević et al., 2017; Pavlić et al., 2018; Sarić-Krsmanović et al., 2019; Šovljanski et al., 2022; Ilić et al., 2022; Đorđević et al., 2022; Milenković et al., 2022; Gladikostić et al., 2023).

Слика 2. Изглед биљке *Ocimum basilicum*Табела 4. Садржај најзаступљенијих компоненти (%) етарског уља *Ocimum basilicum* -
Преглед литературе

Земља порекла	Компоненте (%)	Референце
Србија	метил чавикол (45,8); линалол (24,2); 1,8-синеол (3,4); карофилен (4,5)	(Božin et al., 2006)
Србија	линалол (69,2); α -кадинол (2,56); γ - кадинен (2,5); метил чавикол (2,4)	(Stajković et al., 2007)
Хрватска	линалол (28,6); метил чавикол (21,7); метил цинамат (14,3); α -кадинол (7,1); еугенол (5,9)	(Politeo et al., 2007)
Србија	линалол (69,3); α -кадинол (2,6); γ - кадинен (2,5);	(Soković et al., 2010)
Србија	Е1: линалол (55,71); метил чавикол (16,8); гермакрен D (3,69); Е3: линалол (58,6); метил чавикол (9,24); гераниол (4,27); α -муролол (3,08);	(Jelačić et al., 2011)
	Е2: линалол (61,07); метил чавикол (10,17); гермакрен D (3,53);	
	Е3: линалол (58,6); метил чавикол (9,24); гераниол (4,27); α -муролол (3,08);	

	E4: линалол (71,41); метил чавикол (3,82); гераниол (3,31);	
	E5: линалол (74,73); метил чавикол (2,49); гермакрен D (2,44);	
	E6: линалол (65,25); метил чавикол (10,3); 1,8-синеол (4,44); гермакрен D (2,66);	
	E7: линалол (66,03); метил чавикол (7,09); 1,8-синеол (3,7);	
	E8: линалол (69,76); метил чавикол (5,21); 1,8-синеол (4,1);	
	E9: линалол (61,74); метил чавикол (8,59); гермакрен D (4,9)	
	E10: линалол (51,52); метил чавикол (18,97); гермакрен D (4,18);	
Србија	E1: β -линалол (79,5); 1,8-синеол (8,1); ери- α -кадинол (3,7);	(Radulović et al., 2013)
	E2: β -линалол (44,1); метил чавикол (16,1); ери- α -кадинол (9,3); гераниол (5,1); гермакрен D (3);	
	E3: линалол (55,7); 1,8-синеол (5,3); ери- α -кадинол (7,5);	
	E4: β -линалол (57,6); метил чавикол (22,8); α -линалол (16)	
Србија	E1: линлол (50,4); 1,8-синеол (9,3); α -транс-бергамотен (6,6); α -муролол (5,2); E4: линалол (53,3); гермакрен (5,1); α -муролол (4,9); еугенол (4,3);	(Beatović et al., 2015)
	E2: линалол (30,3); метил чавикол (16,3); α -транс-бергамотен (13,5); α -муролол (5,6);	
	E3: линалол (54,9); α -муролол (4,9) еугенол (4,5); α -транс-бергамотен (4,7);	
	E4: линалол (53,3); гермакрен (5,1); α -муролол (4,9); еугенол (4,3);	
	E5: линалол (34,2); α -транс-бергамотен (14,1); α -муролол (5,9); гермакрен (6,2);	
	E6: линалол (31,8); транс-метил цинамат (31,4);	
	E7: гераниал (16,1); линалол (11,5); β -кариофилен (11); нерал (12,8); транс- α -бисаболен (8); карофилен оксид (7);	
	E8: метил чавикол (83,6); α -транс-бергамотен (4,4);	

	Е9: β -бисаболен (23,8); еугенол (16,2); 1,8-синеол (14,3); метил чавикол (11,8); транс- α -бисаболен (7);	
	Е10: линалол (41,2); 1,8-синеол (5,9); α -транс-бергамотен (19,3);	
	Е11: линалол (32,4); метил чавикол (16); α -транс-бергамотен (10,6); 1,8-синеол (10,2);	
	Е12: линалол (58,6); 1,8-синеол (9,2)	
Босна и Херцеговина	линалол (31,6); метил чавикол (23,8); β -елемен (6,9); α -булнесен (4,5);	(Stanojević et al., 2017)
Србија	линалол (67,71); еугенол (5,46); β -елемен (3,45); α -бергамотен (3,5)	(Pavlić et al., 2018)
Србија	Е1: линалол (13,6); еугенол (10,83); α -бергамотен (8,12); епи-бициклесеквифеландрен (7,03); 1,8-синеол (5,98);	(Ilić et al., 2019)
	Е2: линалол (40,97); метил чавикол (7,92); епи-бициклесеквифеландрен (8,7);	
	Е3: еугенол (8,97); метил чавикол (5,27); α -бергамотен (9,25); епи-бициклесеквифеландрен (8,07);	
Србија	линалол (48,6); 1,8-синеол (9,7);	(Sarić-Krsmanović et al., 2019)
Србија	Е1: линалол (40,5); β -елемен (5,3); гермакрен D (5,3); γ -кадинен (5,3); естрагол (3,2); α -транс-бергамотен (3,1);	(Šovljanski et al., 2022)
	Е2: линалол (71,5); гермакрен D (3); 1,8-синеол (3,4);	
Србија	Е1: линалол (49,7); 1,8-синеол (9,4); α -транс-бергамотен (5,8); еугенол (4);	(Ilić et al., 2022)
	Е2: линалол (52,8); 1,8-синеол (9,4); α -транс- бергамотен (6,7); еугенол (5,59);	
Србија	линалол (58,2); ери- α -кадинол (7,3); гермакрен (5,1); 1,8-синеол (4,9);	(Đorđević et al., 2022)
	линалол (9,06); 1,8-синеол (2,06); α -транс-бергамотен (1,21); ери- α -кадинол (0,93); еугенол (0,83)	
Србија	линалол (10,2); 1,8-синеол (1,26); α -транс-бергамотен (1,47); ери- α -кадинол (1,17); еугенол (1,2)	(Milenković et al., 2022)
Србија	линалол (24,6); метил чавикол (16,99); β -елемен (7,46); гермакрен (4,98)	(Gladikostić et al., 2023)

Истраживања су показале да доминантна једињења етарског уља ртањског чаја представљају карвакрол, тимол, *p*-цимен и γ -терпинен (Mastelić & Jerković, 2003; Radonić & Miloš, 2003; De Oliveira et al., 2011; Marin et al., 2012; Santos et al., 2019). У значајном проценту могу бити присутни и борнеол, линалол, β -кариофилен и кариофилен-оксид, а у мањем проценту могу бити присутни α -тујен, α -терпинен, γ - и α -пинен и мирцен (Skočibušić & Bezić, 2004; Mihajilov-Krstev et al., 2014). Порекло биљке, састав земљишта, климатски услови, старост биљке и вегетативни циклус утичу на састав етарског уља *S. montana* (Mastelić & Jerković, 2003; Kundaković et al., 2014). Стога се на основу разлике у саставу етарског уља може извршити подела на два хемотипа, у зависности од тога да ли у етарском уљу доминирају фенолне компоненте тимол и карвакрол (хемотип А) или терпенски алкохоли линалол, *p*-цимен и α -терпинеол (хемотип Б) (Serrano et al., 2011). Преглед досадашњих резултата испитивања хемијског састава уља ртањског чаја пореклом из Србије и земаља региона дат је у Табели 5, где се може уочити доминантни хемотип А (Milos et al., 2001; Mastelić & Jerković, 2003; Skočibušić & Bezić, 2004; Skočibušić & Bezić, 2004; Ćavar et al., 2008; Vidić et al., 2009; Nikolić et al., 2014; Ćavar et al., 2014; Kundaković et al., 2014; Pavlić et al., 2018; Matković et al., 2018; Aćimović et al., 2019; Đorđević et al., 2021).



Слика 3. Изглед биљне врсте *Satureja montana*

Табела 5. Садржај најзаступљенијих компоненти (%) етарског уља *Satureja montana* -

Преглед литературе

Земља порекла	Компоненте %	Референце
Хрватска	карвакрол (60,93); 1,8-синеол (19,45); β -кариоилен (3,68)	(Kustrak et al., 1996)
	Е1: карвакрол (65,98); <i>p</i> -цимен (12,94)	
	карвакрол (67,88); γ -теринен (7,06); линалол (3,56)	
Хрватска	Е2: карвакрол (30,86); <i>p</i> -цимен (15,86); тимол (13,61); линалол (5,39)	(Milos et al., 2001)
	Е3: карвакрол (31,79); <i>p</i> -цимен (19,12); тимол (8,01); линалол (6,61)	
	Е1: карвакрол (25,3); линалол (24,8); тимол (15); γ -теринен (7,2); тимол метил етар (6,8);	
Хрватска	Е2: карвакрол (52,4); тимол (11); γ -теринен (5,8); карвакрол метил етар (4,6)	(Slavkovska et al., 2001)
	Е3: карвакрол (30,4); тимол (20,6); гераниол (9,2); карвакрол метил етар (7); γ -теринен (6,5)	
	<i>p</i> -цимен (13,3); т-сабинен хидат (9,3); линалол (8,1); <i>p</i> -цимен-8-ол (8,6); борнеол (7,1); терпинен-4-ол (5,9)	
Босна и Херцеговина	линалол (22,8); <i>p</i> -цимен (18,8); борнеол (10,6); т-сабинен хидат (7,2)	
Хрватска	Е1: тимол (46,02); γ -теринен (9,49); <i>p</i> -цимен (7,1); тимол метил етар (5,1); карвакрол метил етар (4,6); карвакрол (4,52);	(Mastelić & Jerković, 2003)
	Е2: тимол (30,88); <i>p</i> -цимен (13,48); γ -теринен (9,74); гераниол (6,43); карвакрол метил етар (4); борнеол (4);	
	Е3: тимол (35,41); <i>p</i> -цимен (12,36); γ -теринен (7,57); карвакрол (6,86); карвакрол метил етар (5,11); тимол метил етар (4,99)	
Хрватска	Е1: карвакрол (52,4); тимол (11); γ -теринен (5,8); метил карвакрол (4,6);	(Skočibušić & Bezić, 2004)
	Е2: карвакрол (26,2); гераниол (10,2); <i>p</i> -цимен (15,2); метил карвакрол (6,4); геранил ацетт (5,2)	
	Е3: <i>p</i> -цимен (25,6); карвакрол (16,1); метил тимол (12,8) борнеол (11,5);	
Хрватска	карвакрол (45,7); <i>p</i> -цимен (12,6); карвакрол метил етар (11); γ -теринен (8,1); борнеол (4,8)	(Skočibušić & Bezić, 2004b)
Хрватска	карвакрол (45,7); <i>p</i> -цимен (12,6); карвакрол метил етар (11); борнеол (4,8); тимол (3,9)	(Bezić et al., 2005)
Црна Гора	тимол (33,4); <i>p</i> -цимен (28,8); β -бисаболен (4,7); карвакрол (4,2); борнеол (3,8)	(Bezbradica et al., 2005)
Босна и Херцеговина	Е1: тимол (31,7); карвакрол (23,3); кариофилен оксид (7,7); 14-хидрокси-9-епи- β -кариофилен (4,1);	(Ćavar et al., 2008)

	E2: гераниол (22,3); карвакрол (10,6); терпинен-4-ол (10,3); кариофилен оксид (5,2); борнеол (4,8); тимол (3,8)	
Хрватска	карвакрол (59,1); тимол (20,1); борнеол (5,3)	(Vidić et al., 2009)
Црна Гора	тимол (27,68); <i>p</i> -цимен (31,37); γ -теринен (8,66); терпинен-4-ол (5,24)	(Damjanović-Vratnica et al., 2011)
Хрватска	карвакрол (44,5); <i>p</i> -цимен (16,9); γ -теринен (8,7); борнеол (5);	(Marin et al., 2012)
Црна Гора	карвакрол (50,1); <i>p</i> -цимен (10,12); γ -теринен (8,79); кариофилен (8,71);	(Popović et al., 2013)
Босна и Херцеговина	тимол (44,6); <i>p</i> -цимен (13,4); карвакрол (6,2); цис-сабинен хидрат (4,7);	(Nikolić et al., 2014)
Хрватска	карвакрол (63,4); тимол (19,4); борнел (4,2);	(Ćavar et al., 2014)
Македонија	E1: карвакрол (20,9); <i>p</i> -цимен (17,1); β -линалол (15,2); карвакрол метил етар (11,8); γ -теринен (5); спатуленол (4) E2: карвакрол (37,6); тимол (24,5); γ -теринен (8,2); <i>p</i> -цимен (6,8)	(Kundaković et al., 2014)
Црна Гора	E1: линалол (15,38); <i>p</i> -цимен (6,61); борнеол (3,8); цис-сабинен хидрат (3,5); E2: линалол (17,94); цис-сабинен хидрат (14,61); <i>p</i> -цимен (5,38); борнеол (3,62); E3: линалол (32,58); цис-сабинен хидрат (23,05)	(Mihajilov-Krstev et al., 2014)
Румунија	карвакрол (63,4); <i>p</i> -цимен (10,97); γ -теринен (3,7)	(Trifan et al., 2015)
Румунија	карвакрол (60,9); γ -теринен (9,4); <i>p</i> -цимен (8,3)	(Jianu et al., 2015)
Црна Гора	<i>p</i> -цимен (26,4); карвакрол (17,92); тимол (14,97); линалол (5,7);	(Hajdari et al., 2016)
Црна Гора	<i>p</i> -цимен (16,6); лимонен (10,8); α -пинен (6,1); борнеол (5,5); виридифлор (5,4)	(Bojović et al., 2018)
Србија	карвакрол (92,2)	(Pavlić et al., 2018)
Босна и Херцеговина	тимол (44,6); <i>p</i> -цимен (13,4); карвакрол (6,29)	(Matković et al., 2018)
Србија	карвакрол (59,16); <i>p</i> -цимен (6,48); сквален (3,91)	(Šojić et al., 2019)
Србија	карвакрол (43,2); тимол (28,4);	(Aćimović et al., 2019)
Босна и Херцеговина	линалол (38,7); α -терпениол (14,7); кариофилен оксид (6,7)	(Čopra-Janićijević et al., 2020)
Србија	карвакрол (26,6); тимол (16,7); <i>p</i> -цимен (7,3); борнеол(5,6); карвакрол метил етар (4,5)	(Đorđević et al., 2021)
Црна Гора	<i>cis</i> -сабинен-хидрат (24,8); гермакрен D (3,1) бициклогермакрен (2,7)	(Dodoš et al., 2021)
Босна и Херцеговина	тимол (40,5) γ -терпинен (18,8); <i>p</i> -цимен (11,9)	
Србија	карвакрол (55,01); <i>p</i> -цимен (14,71); γ -терпинен (11,09)	(Kovačević et al., 2021)

Србија	карвакрол (35,7); <i>p</i> -цимен (32,3); γ -терпинен (10,5)	(Aćimović et al., 2022)
Србија	<i>p</i> -цимен (42,8); карвакрол (28,1); γ -терпинен (14,6);	(Štrbac et al., 2022)
Србија	<i>p</i> -цимен (19,24); геранил ацетат (12,64); линалол (11,93); гераниол (10,15); лимонене (7,83); борнеол (5,25);	(Gladikostić et al., 2023)
Босна и Херцеговина	карвакрол (54,9); γ -терпинен (14,5); <i>p</i> -цимен (8,8);	(Kulić et al., 2023)
Србија	карвакрол (53,58); γ -терпинен (14,39); <i>p</i> -цимен (12,12)	(Šojić et al., 2023)

1.4.2. Антимикробна активност етарских уља и интеракција са конвенционалним антибиотицима - Преглед литературе

Последњих неколико деценија обележио је велики број истраживања која су испитивала антимикробни (нпр. Akthar et al., 2014; Calo et al., 2015; Tardugno et al., 2018; Tariq et al., 2019; Cáceres et al., 2020), антибиофилм и антивирулентни (нпр. Artini et al., 2018; Reichling, 2020) потенцијал етарских уља и њихових компоненти. Употреба комбинације лекова у антимикробном третману показала је боље ефекте у односу на третмане у којима је био укључен један антимикробни агенс, јер је често један антимикробни агенс повезан са резистенцијом. Због сложености у хемијском саставу до сада није описано да су бактерије развиле посебне адаптације на тестирана етарска уља (Mikulášová et al., 2016). Захваљујући постојећем антимикробном потенцијалу, комбинације између различитих антибиотика и других антимикробних супстанци као што су етарска уља, представљају један од најперспективнијих напретка у борби против резистенције микроорганизама на лекове. Интеракције између антимикробних компоненти могу показати три различита исхода и то синергизам, адитивни ефекат или антагонизам (Chouhan et al., 2017).

Међу спроведеним истраживањима нашла су се и истраживања која су испитивала антимикробну активност етарског уља *Salvia officinalis* на сојеве *Pseudomonas aeruginosa*, а МИК концентрације износиле су 113,63 $\mu\text{l/ml}$ (Aćimović et al., 2019), 7,49 mg/ml (Adrar et al., 2016) и 40 mg/ml (Niculae et al., 2009). Са друге стране, у одређеном броју истраживања (Hammer et al., 1999; Delamare et al., 2007; Božin et al., 2007; Damjanović-Vratnica et al., 2008; Khalil & Li, 2011; El-Hosseiny et al., 2014; Aćimović et al., 2022) етарско уље *Salvia officinalis* није показало активност на сојеве *P. aeruginosa*.

Антимикробна активност уља *Salvia officinalis* испитана је и на сојење *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*, а МИК концентрације кретале су се у опсегу 14,2-56,81 $\mu\text{l/ml}$ (Аџимовић, et al., 2022) и 0,1-20 mg/ml (Hammer et al., 1999; Delamare et al., 2007; Adrar et al., 2016). Са друге стране у истраживању Fournomiti et al. (2015) уље није показало активност на наведене сојење.

Етарско уље *Ocimum basilicum* показало је активност на сојење *P. aeruginosa* при МИК концентрацијама опсега 1,02-40 mg/ml (Hammer et al., 1999; Niculae et al., 2009; Silva et al., 2016; Ђорђевић et al., 2022). Активност наведеног уља на сојење *P. aeruginosa* није уочена у истраживањима Bassolé и сарадника (2010), Илић и сарадника (2021) и Шовљански и сарадника (2022). На сојење *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* наведено уље остварило је антимикробну активност при концентрацијама које су се кретале у опсегу 5-20 mg/ml (Hammer et al., 1999; Usman et al., 2013; Sakkas et al., 2016; Ђорђевић et al., 2022).

Satureja montana етарско уље испољило је антимикробну активност на сојење *P. aeruginosa* при концентрацијама 0,05-15,52 mg/ml (Ћавар et al., 2008; Miladi et al., 2013; Kundaković et al., 2014; Maccelli et al., 2020; Ђорђевић et al., 2021) и 3,5 $\mu\text{l/ml}$ (Аџимовић et al., 2019). Међутим, поједина истраживања показала су да наведено уље није испољило антимикробни ефекат на *P. aeruginosa* (Skocibusić & Bezić, 2004; Bezić et al., 2005; Bezbradica et al., 2005; Marin et al., 2012; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Nikolić et al., 2014; Аџимовић et al., 2022). Када је наведено уље тестирано на изолате *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*, показало је активност при МИК концентрацијама које су се кретале у опсегу од 0,02 до 25 mg/ml (Skočibušić & Bezić, 2004; Kundaković et al., 2014; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Maccelli et al., 2020; Ђорђевић et al., 2021; Kovačević et al., 2021). Осим на наведене патогене, уље ртањског чаја испитивано је и на *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*; *Listeria monocytogenes* и *Listeria innocua* (Serrano et al., 2011; Santos et al., 2019; Vitanza et al., 2019).

Последњих година велики број истраживања испитивао је утицај широког спектра етарских уља и њихових компоненти на повећање активности конвенционалних лекова. Истраживања су спровођена на велики број патогена међу којима су и *Pseudomonas aeruginosa* и врсте рода *Klebsiella* (Longaray et al., 2007; Nemaishwarya & Doble, 2009; Van Vuuren et al., 2009; Yap et al., 2014; Langeveld et al., 2014; Aelenei et al., 2016; Chouhan et al., 2017).

Међу спроведеним истраживањима нашла су се и она која су испитивала утицај уља жалфије на активност антибиотика, па је тако показано да уље жалфије повећава

активност пиперацилина, меропенема и гентамицина на сојеве *P. aeruginosa* (El-Hosseiny et al., 2014) и ципрофлоксацина на *S. aureus* MRSA сојеве (Milenković et al., 2015). Интеракција наведеног уља са цефотаксимом показала је антагонизам на сојеве *E. coli* (Adrar et al., 2016).

Уље босиљка у комбинацији са ципрофлоксацином показало је синергизам на сојеве *P. aeruginosa* (Mahmoud et al., 2016; Silva et al., 2016) и *K. pneumoniae* (Mahmoud et al., 2016). Синергизам је уочен и у комбинацији уља босиљка са тетрациклином и хлорамфениколом на сојеве *L. innocua*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* и *E. coli* (Barzegar et al., 2019).

Интеракције између уља ртањског чаја и антибиотика на сојеве *P. aeruginosa* и врсте рода *Klebsiella* нису до сада испитиване, али је показано да ово уље појачава активност гентамицина на сојеве *E. coli* и *S. aureus* (Vitanza et al., 2019). У комбинацији са низином, уље ртањског чаја показало је синергистичку реакцију на сојеве *E. coli*, док је на *S. aureus* наведена комбинација показала индиферентни ефекат (Babaei et al., 2018).

1.4.3. Антибиофилм и антивирулентни ефекат етарских уља и њихових компоненти - Преглед литературе

Истраживања на тему антибиофилм активности показала су да етарска уља мајчине душице (Ceylan & Ugur, 2015), оригана (Schillaci et al., 2013), чајног дрвета (Comin et al., 2016), рузмарина (Araby & El-Tablawy, 2016), цимета (Kim et al., 2015), менте (Husain et al., 2015), *Syzygium aromaticum* (Khan et al., 2009; Alibi et al., 2020), *Cuminum cyminum* (Paskiavathy et al., 2012) значајно редукују продукцију биофилма код соја *P. aeruginosa*. Нека од уља показују и инхибицију QS комуникације, а утичу и на смањење продукције фактора вируленције у третираним биофилмовима (Husain et al., 2013; Husain et al., 2015; Luciardi et al., 2016).

Истраживања која су испитивала утицај етарских уља на продукцију биофилма врсте рода *Klebsiella* показују да етарска уља цимета (Wijesinghe et al., 2021), ђумбира (Das et al., 2019), рузмарина (Abdulhasan, 2015; Abdulhasan et al., 2016), *Cupressus sempervirens* (Selim et al., 2014), мајчине душице (Mohamed et al., 2018; Alibi et al., 2020; Iseppi et al., 2020), чајног дрвета (Iseppi et al., 2020), еукалиптуса (Khalaf & Zahra, 2020) и пеперминта (Mohamed et al., 2018) значајно редукују биофилмове *K. pneumoniae*. Етарска уља мајчине душице, цимета, каранфилића и мајорана редукују и биофилмове

K. oxytoca (Alibi et al., 2020), док уља лимуна и ђумбира такође доводе до редукције биофилма код врста *K. ornithinolytica*, *K. oxytoca* и *K. terrigena* (Avcioglu et al., 2016). Нека од уља утичу и на факторе вируленције редукујући продукцију фимбрија и пила (Abdulhasan, 2015).

Етарско уље *S. officinalis* није до сада испитивано на биофилмове наведених сојева, али је наведено уље при концентрацији од 0,5 mg/ml инхибирало продукцију биофилма и довело до деградације већ формираног биофилма код сојева *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 и ATCC 49399 (Wijesundara & Rupasinghe, 2018). Утицај уља *O. basilicum* такође није испитиван на продукцију биофилмова соја *P. aeruginosa* и врсте рода *Klebsiella*, али је ово етарско уље при МИК концентрацији инхибирало продукцију биофилма и деградовало већ формирано биофилм врсте *C. albicans* (Piras et al., 2018). На продукцију биофилма *P. aeruginosa* и сојеве рода *Klebsiella*, није испитан ни ефекат етарског уља *S. montana*, али је показано да ово уље у субинхибиторним концентрацијама МИК/4 и МИК/8 утиче на продукцију биофилма током 24 h и зреле биофилмове сојева *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 25922 и крвног изолата *L. monocytogenes* LM9 (Vitanza et al., 2019). Етарско уље *S. montana* инхибира стварање биофилмова код различитих сојева *Salmonella* spp., а најнижа концентрација при којој је инхибиција уочена кретала се између 0,6-6,45 mg/ml (Miladi et al., 2016).

Према резултатима истраживања које су испитивале антибиофилм потенцијал чистих компоненти уља, куркумин (Paskiavathy et al., 2014) и цинамалдехид (Zhou et al., 2013) показали су велику ефикасност у редукцији биофилма *P. aeruginosa*. Еугенол инхибира и до 45% продукције биофилма *P. aeruginosa* (Zhou et al., 2013; Kim et al., 2015), док утицај линалола на продукцију биофилма ове врсте није уочена (Kim et al., 2015). Карвакрол и тимол су редуковали продукцију биофилмова наведеног соја до 90% (Soumya et al., 2011), а овај ефекат потврђен је и у истраживањима Tapia-Rodriguez и сарадника (2017) и Raei и сарадника (2017).

Истраживања показују да на редукцију биофилма *K. pneumoniae* значајан ефекат имају и чисте компоненте етарских уља као што су тимол и карвакрол (Raei et al., 2017; Kwiatkowski et al., 2022), гераниол (Kwiatkowski et al., 2022), 1,8-синеол (Vazquez et al., 2022) и еугенол (Qian et al., 2020; Liu et al., 2023). Међутим Elken и сарадници (2022) су показали да еугенол у субинхибиторним концентрацијама промовише продукцију биофилма *K. pneumoniae*.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

- Изолација и идентификација сојева из хуманог материјала различитог порекла.
- Испитивање осетљивости изолата на најчешће коришћене антибиотике у терапији инфекција изазваним овим сојевима бактерија.
- Тестирање изолата на продукцију биофилма и фактора вируленције специфичних за род/врсту.
- Хемијска карактеризација комерцијалних етарских уља и поређење њиховог састава са досадашњим резултатима.
- Испитивање антимикробне активности наведених етарских уља.
- Испитивање утицаја уља на раст наведених изолата током времена.
- Испитивање активности етарских уља на различите фазе продукције биофилма.
- Испитивање ефекта наведених етарских уља на факторе вируленције изолата *Pseudomonas aeruginosa* и врста рода *Klebsiella*.
- Испитивање синергистичког потенцијала етарских уља у комбинацији са антибиотиком ципрофлоксацином.
- Испитивање типа интеракције између тестираних етарских уља у односу на тест сојеве микроорганизама.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Етарска уља

У овом истраживању испитивана су комерцијална етарска уља жалфије (*Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), Montes, Leskovac) и босиљка (*Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae), MyGreenWay, Ниш) купљена у биљној апотеци Beyond у Нишу. Због недостатка етарског уља ртањског чаја на тржишту у Србији, а са друге стране велике употребе сувог биљног материјала ртањског чаја у традиционалној медицини одлучено је да се из материјала који се може наћи на тржишту изолује етарско уље. У истој апотеци купљена је и сува биљна мешавина ртањског чаја (*Satureja montana* L. (Lamiaceae), Адонис, Алексинац) из које је методом хидродестилације изоловано етарско уље у Лабораторији за микробиологију Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу.

3.2. Бактеријски сојеви

У овом истраживању испитивани су клинички изолати врсте *Pseudomonas aeruginosa* и изолати рода *Klebsiella* spp. Бактеријски изолати добијени су из поликлинике “Хуман” у Нишу. Сви тестови су рађени у Лабораторији за микробиологију Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу. Анализирано је укупно 29 изолата *Pseudomonas aeruginosa* пореклом из узорка урина, бриса грла, бриса ране, бриса ока, бриса уха, бриса коже и 9 изолата *Klebsiella* spp. пореклом из узорка урина, бриса ране и бриса коже.

Културе микроорганизама одржаване су на хранљивом агару (ХА) на оптималној температури (37 °C). За експерименте, испитивани сојеви гајени су 18 сати на ХА како би се добиле културе у експоненцијалној фази раста. Преконоћне културе коришћене су за припрему суспензија у физиолошком раствору (0,85% NaCl). Оптичка густина суспензија подешавана је денситометром (DEN-1 McFarland Densitometer, Biosan) на 0,5 McFarland турбидитет, што одговара густини од 10^8 ћелија/ml.

3.3. Гасна хроматографија са масеном спектрометријом (ГХ-МС)

Узорак етарских уља испитан је методом гасне хроматографије и гасне хроматографије са масеном спектрометријом (ГХ-МС) на Hewlett-Packard 6890N гасном хроматографу, са DB-5MS капиларном комором (5% фенилметилсилаксон, 30 mm × 0,25 mm, дебљина филма 0,25 μm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Гасни хроматограф био је повезан са масеним детектором MSD 5975B исте компаније. Ињектор и интерфејс били су подешени на 250 °C односно 310 °C. Радна температура је са 70 °C повишена на 290 °C, са брзином загревања од 5 °C/min, након чега је постојао изотермални период од још 5 минута. Као носећи гас коришћен је хелијум брзином 1,0 ml/min. Узорци (40 mg узорака у 1 ml диетилетра (ET₂O)) су ињектирани у импулсном сплит режиму (40:1) (проток је био 1,5 ml/min за првих 0,5 min, а затим је детектор подешен на 1,0 ml/min током остатка анализе). Селективни масени детектор деловао је при енергији јонизације 70 eV, у опсегу 35–650 amu и брзини скенирања од 0,34 s (Mladenović, 2017).

Гасна хроматографија са пламенским јонизационим детектором (ГЦ-ФИД) анализа је извршена под истим експерименталним условима, користећи исту колону као што је описано за ГХ МС. Процентуални састав састојака рачунат је на основу ГХ пикова без коришћења фактора корекције.

Квалитативна анализа компоненти етарских уља базирана је на компарацији линеарних ротационих индекса (РИ), веза за време ротације C7–C40 n- алкана у DB-5MS колонама (van Den Dool & Kratz, 1963) са подацима у литератури.

3.4. Осетљивост изолата на антибиотике

Тестови осетљивости рађени су по стандардном EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) v 0.5 протоколу (EUCAST, 2015). Изолати су култивисани на крвном агару 24 h на 37 °C. Бактеријска суспензија клиничких изолата направљена је у 0,85% раствору NaCl (w/w) и подешена на турбидитет од 0,5 McFarland јединица. Милер Хинтон агар инокулисан је припремљеном суспензијом и разливен у плоче, а на површину су додати дискови антибиотика.

Осетљивост изолата *Pseudomonas aeruginosa* тестирана је на: пиперацилин-тазобактам (ТЗП), имипенем (ИМП), меропенем (МЕР), цефепим (ЦФПМ), цефтазидим

(ЦФТ), ципрофлоксацин (ЦПР), амикацин (АМК), ампицилин (АМП) и гентамицин (ГЕН).

Осетљивост изолата *Klebsiella* spp. тестирана на ампицилин (АМП), гентамицин (ГЕН), ципрофлоксацин (ЦПР), левофлоксацин (ЛВХ), фосфомицин (ФОС), цефалексин (ЦЕХ), цефотаксим (ЦТХ), цефуроксим (ЦХМ), цефиксим (ЦФЕ), цефтазидим (ЦФТ), цефепим (ЦФПМ), имипенем (ИМП), меропенем (МЕР), триметоприм-сулфаметазол (СХТ) и амоксицилин-клавулонску киселину (АМЦ).

Након инкубације од 24 h на 37 °C измерене су зоне инхибиције око дискова и резултати су интерпретирани као вредности (С-сензитиван (осетљив) / И-интермедијерно осетљив / Р-ресистентан) на основу EUCAST v 5.0 критеријума (EUCAST, 2015).

3.5. Испитивање антимикробне активности етарских уља

Антимикробна активност етарских уља одређена је микродилуционом методом у микротитар плочама са 96 бунарића као што је претходно описано (Stojanović-Radić et al., 2018). Суспензије преконоћних култура изолата, гајених на хранљивом агару 18 h на 37 °C, прављене су у физиолошком раствору. Оптичка густина суспензија је подешавана на 0.5 McFarland јединица, а затим разблажена на 10^6 ћелија/ml у Хранљивом бујону (ХБ). Овако подешене суспензије коришћене су за даљи експериментални рад. Штокови уља растворених у диметил сулфоксиду (ДМСО, 100%) су серијски разблажени (фактор разблажења 2x) у стерилном ХБ. Након припреме серијских разређења тестираних уља, у бунариће је додат инокулум и плоче су остављене на инкубацију 24 h на 37 °C. Највиша концентрација растварача ДМСО била је 5% (v/v), за коју је претходно утврђено да не утиче на вијабилност ћелија. Као позитивна контрола коришћен је антибиотик ципрофлоксацин, а као негативна контрола сам растварач ДМСО. Остављен је и неинокулисани бунарић који је садржао само подлогу без додатка агенса, како би се испитала стерилност саме подлоге. Бактеријски раст након инкубације плоче детектован је додатком 20 μ l 0,5% стерилног воденог раствора трифенил тетразолијум хлорида (енг. triphenyltetrazolium chloride, ТТЦ) и плоча је остављена на инкубацију 30 минута. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) дефинисана је као најнижа концентрација која инхибира видљиви бактеријски раст (црвено обојени талог на дну бунарића након додатка ТТЦ-а).

3.6. Одређивање активности етарских уља током времена и формирања криве раста

Активност етарских уља током времена одређена је „Time-kill“ методом и формирањем крива раста. Ова метода проучава ефекат антимикуробног агенса на раст ћелија у култури током одређеног временског периода, чиме се уочава динамика и трајање ефекта агенса. Бактеријска суспензија подешена је као што је описано у одељку 3.5. и разблажена у Милер Хинтон бујону како би се добила густина ћелија 10^6 CFU/ml (CFU- colony forming unit) која се користи у тесту. Штокови уља направљени су у 5% ДМСО, након чега су додавани у инокулисане бунариће микротитар плоче тако да је финална концентрација у њима одговарала МИК концентрацијама. Овако припремљене плоче инкубирани су на температури од $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Активност уља у минималним инхибиторним концентрацијама праћена је мерењем густине ћелија током 48 h на 600 nm (Stojanović-Radić et al., 2012).

3.7. Одређивање типа интеракције антимикуробних агенаса

Интеракција између антимикуробних агенаса одређена је методом шаховске табле (енг. checkerboard методом) у микротитар плочама са 96 бунарића (Silva et al., 2016). Тестиране су комбинације етарских уља и антибиотика ципрофлоксацина, као и комбинације два етарска уља. Испитиване концентрације агенаса кретале су се у опсегу $1/32 - 2 \times$ МИК. За припрему штока уља коришћен је 100% ДМСО. Један агенс је наносен вертикално, а други хоризонтално у плочу у волуменима од по 25 μl . Након тога, у све бунариће микротитар плоче убачено је 150 μl инокулисаног бујона, где је финална концентрација бактерија износила 10^6 ћелија/ml. Овако припремљене плоче су инкубирани током 24 h на температури од $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, а затим је прочитан раст бактерија. Да би се одредила активност тестираних комбинација, рачунат је ФИКИ индекс (индекс фракционе инхибиторне концентрације) према следећим формулама:

$$\text{ФИК}_A = \text{МИК}_{A-B} / \text{МИК}_A$$

$$\text{ФИК}_B = \text{МИК}_{B-A} / \text{МИК}_B$$

$$\text{ФИКИ} = \text{ФИК}_A + \text{ФИК}_B$$

ФИК_А и ФИК_Б (фракциони инхибиторни коефицијенти) представљају индексе минималне концентрације тестираног агенса А и агенса Б које инхибирају раст бактерија. МИК_{А-Б} је МИК агенса А у комбинацији са агенсом Б, МИК_А је МИК агенса А појединачно. МИК_{Б-А} је МИК агенса Б у комбинацији са агенсом А, а МИК_Б је МИК агенса Б појединачно. На основу ФИКИ индекса дефинише се тип интеракције између супстанци. Према EUCAST протоколу (EUCAST, 2015) када је ФИКИ < 0,5 интеракција се дефинише као синергизам; када је ФИКИ између 0,5 и 1 у питању је адитивни ефекат; ефекат се сматра индиферентним ако је ФИК између 1 и 2, а ако су вредности веће од 2 у питању је антагонизам.

3.8. Продукција биофилма

3.8.1. Продукција биофилма у фази пре адхезије (Pre-adhesion biofilm formation)

Способност продукције биофилма одређена је методом бојења кристал виолетом по методи Stepanović et al. (2007) уз одређене модификације. Преконоћне културе сојева гајене на ХА коришћене су за прављење суспензија густине 0,5 McFarland (~10⁸ CFU/ml) у физиолошком раствору. У бунариће плоча наношено је по 200 μ l Триптон соја бујона (ТСБ) са додатком 0,5% глукозе, а затим из суспензије бактерија засејано 2 μ l. Финална густина ћелија у бунарићима је била 10⁶ CFU/ml. Овако инокулисане плоче остављене су на инкубацију 24 h на температури од 37 °C. Након инкубације, планктонске ћелије су пажљиво аспириране, како се не би оштетио формиран биофилм. Бунарићи су затим испирани 2 пута раствором ПБС (Phosphate buffer saline, pH=7,4), осушени и обојени 0,5% кристал виолетом и плоче су остављене на инкубацију 20 min на собној температури. Након инкубације, вишак боје уклоњен је испирањем физиолошким раствором. Затим је додато 200 μ l етанола (96%) и плоче су остављене још 30 минута на инкубацију на собној температури. После ове инкубације, 100 μ l раствора пребачено је у нове плоче и читавана је оптичка густина (апсорбанца) раствора на 595 nm ELISA читачем (Multiscan TM FC Microplate Reader, Thermo Scientific).

На основу добијених вредности апсорбанци, изолати су класификовани у четири категорије према Stepanović et al. (2007) (Табела 6.). Гранична вредност $ОД_{г}$ дефинисана је на следећи начин:

$$ОД_{г} = \text{средња вредност } ОД_{н} + 3 \times СД (ОД_{н})$$

Где су $ОД_{н}$ - оптичка густина негативне контроле (стерилни бујон) и $СД$ - стандардна девијација негативне контроле.

Табела 6. Категоризација изолата на основу апсорбанци

Апсорбанца (ОД)	Продукција биофилма
$ОД \leq ОД_{г}$	Нема продукције биофилма
$ОД_{г} \leq ОД \leq (2 \times ОД_{г})$	Слаб продуцент
$(2 \times ОД_{г}) < ОД \leq (4 \times ОД_{г})$	Умерен продуцент
$(4 \times ОД_{г}) < ОД$	Јак продуцент

ОД- апсорбанца узорка

3.8.2. Формирање биофилма након фазе адхезије (Post-adhesion biofilm formation)

Да би утврдили продукцију биофилма након иницијалне адхезије ћелија, плактонске (неадхериране) ћелије су аспириране из бунарића након иницијалне адхезије ћелија. Микротитар плоче инокулисане су истим поступком као што је описано у претходном поглављу и инкубиране током 2 h на температури од 37 °C. Након инкубације уклањане су плактонске ћелије и бунарићи испирани (стерилни физиолошки раствор, 200 μ l), после чега је у сваки испрани бунарић додато по 200 μ l свежег стерилног ТСБ. По завршетку ове процедуре, плоче су инкубиране додатних 22 h на 37 °C. Затим су инкубиране плоче подвргнуте истом поступку за квантификацију биофилма као што је претходно описано.

3.8.3. Формирање зрелог биофилма

За квантификацију зрелог биофилма инокулум је припремљен као што је описано у делу 3.8.1. Плоче су инкубиране 24 h на температури од 37 °C. Након тога, планктонске ћелије и подлога су уклоњени и бунарићи су испрани физиолошким раствором. Затим је

додат свеж стерилни ТСБ и плоче су остављене на инкубацију још додатних 24 h на 37 °C. Квантификација зрелог биофилма извршена је по већ описаној процедури (кристал виолет метода).

3.9. Антибиофилм тестови

Ефекат етарских уља на продукцију биофилма тестиран је на све три фазе формирања биофилма (фаза пре адхезије, фаза након адхезије и зрео биофилм). Да би испитали утицај етарских уља на иницијалну адхезију ћелија (фаза пре адхезије) уља су наносена у самом старту кад и инокулум. Утицај уља на формирање биофилма након ћелијске адхезије испитиван је наносењем уља након 2 h култивације инокулума. Како би утврдили ефекат уља на деградацију већ формираног зрелог биофилма уља су наносена након 24 h инкубације. Уља су растварана у ДМСО (10%) и даље разблаживана да би се добиле жељене концентрације.

3.10. Фактори вируленције

3.10.1. Тестови покретљивости

Способност одређеног типа покретљивости (swimming, swarming и twitching – пливање, ројење и трзање) код изолата *Pseudomonas aeruginosa* испитивана је употребом специјалних получврстих (Swimm и Swarm) и чврстих агара (Twitch) као што је претходно описано (Radulović et al., 2018). Бактеријска суспензија подешена на 10^6 ћелија/ml наносена је езом на центар површине Swarm и Swimm агара, док је на Twitch агару инокулација извршена до дна агара бактериолошком иглом.

Swimm агар коришћен за одређивање покрета пливања имао је следећи састав: 10 g/l триптон, 5 g/l NaCl и 0,3% (w/v) технички агар. За покрете ројења коришћен је Swarm агар који је садржао 5 g/l агара и 8 g/l хранљивог бујона, уз додатак 5 g/l глукозе, док је Twitch агар садржао 10 g/l триптона, 5 g/l екстракта квасца, 5 g/l NaCl и 10 g/l агара. Подлоге су остављене да се осуше на собној температури преко ноћи, пре него што су коришћене. Након инокулације, за покрете пливања плоче су инкубирани 12-14 h на 37 °C, док је период инкубације за остале покрете износио 24 h на истој температури.

Очитавање резултата вршено је по завршетку периода инкубације тако што је за покрете пливања и ројења мерена зона раста колонија. За покрете трзања, најпре је уклоњена подлога а дно Петри посуде бојено кристал виолетом (0,1%) у трајању од 1 минута, што је омогућило визуализацију зона „twitching“ покрета и мерење њиховог пречника.

3.10.2. Ефекат етарских уља на покрете пливања, ројења и трзања

Утицај етарских уља на покрете испитиван је у минималним инхибиторним концентрацијама (МИК), двоструко јачим (2 x МИК) и субинхибиторним концентрацијама (МИК/2). Штокови уља растварани су у ДМСО (10%) и даље разблаживани како би се добиле жељене концентрације. Уља су додавана у припремљене подлоге, које су затим разливане у Петријевим посудама. Подлога са додатком само растварача коришћена је као контрола. Након тога су на подлоге инокулисане бактеријске суспензије као што је већ описано. Сви тестови су извођени у трипликату.

3.10.3. Продукција пиоцијанина

Продукција пиоцијанина изолата *Pseudomonas aeruginosa* одређивана је по методи Husain et al. (2013) са модификацијама. МХБ је инокулисан бактеријском суспензијом (тако да је коначна густина ћелија у бујону била 10^6 ћелија/ml) и инкубиран 72 h на 37 °C. Након инкубације, ћелије су таложене центрифугирањем (3000 rpm, 15 min) и настали супернатант је коришћен за екстракцију пиоцијанина. У 5 ml супернатанта додато је 2 ml хлороформа. Раствор је вортексован 2 min, а потом центрифугиран још 15 min (3000 rpm). Овако формиран слој са пиоцијанином пребачен је у нову епрувету где му је додато 2 ml 0,2 M хлороводоничне киселине (HCl). Тако припремљен раствор је поново центрифугиран на 3000 rpm 5 min. Одвојен је црвено-розе слој и мерена је његова апсорбанца на 520 nm.

3.10.4. Утицај етарских уља на продукцију пиоцијанина

У течну подлогу инокулисану суспензијама припремљеним на већ описан начин додата су етарска уља у МИК и МИК/2 концентрацијама, које су затим инкубиране 72 h на 37 °C. Након инкубације пиоцијанин је екстрахован по методи наведеној у претходном поглављу и мерена је његова апсорбанца на 520 nm.

3.11. Статистичка обрада података

Сви експерименти су извођени у трипликату, а подаци су приказани као просечне вредности \pm стандардне девијације. Подаци су анализирани применом One way или Two way ANOVA тестом праћеним Tukey post hoc тестом. Анализе су изведене коришћењем статистичког софтвера GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Prism version 5.03, San Diego, CA, USA). У оквиру свих мерења вредност $p < 0,05$ је сматрана статистички значајном.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Хемијска карактеризација уља жалфије, босиљка и ртањског чаја

Резултати ГХ и ГХ-МС приказани су у Табели 7, у којој су наведене идентификоване компоненте етарског уља *S. officinalis*, Табели 8 у којој су наведене компоненте уља *O. basilicum* и Табели 9, у којој су наведене компоненте етарског уља *S. montana*. На крају Табела 7, 8 и 9 дата је процентуална заступљеност сваке класе једињења у односу на укупан број идентификованих компоненти.

У етарском уљу жалфије идентификовано је укупно 40 компоненти, што чини 99,8% укупног састава уља. Фракција монотерпена чини 82,6% уља од чега је већи удео оксигенованих монотерпена (67,4%) док свега 15,2% чине монотерпени. У оквиру групе оксигенованих монотерпена α -тујон (29,7%), камфор (16,6%) и 1,8-синеол (9,2%) представљају главне компоненте. Због оваквог састава тестирано комерцијално уље жалфије припада типичном α -тујон/камфор хемотипу уља (Craft et al., 2017). Овај хемотип уља карактеристичан је за популацију *S. officinalis* пореклом из југоисточне Србије (Couladis et al., 2002; Veličković et al., 2002; Radulović et al., 2017; Aćimović, et al., 2022). Популација пореклом из Сићевачке клисуре показала је присуство α -тујона (19,54%), 1,8-синеола (16,66%), камфора (9,75%), α -хумулена (7,95%) и виридифлорола (9,59%), док су у другој популацији са истог локалитета, доминанте компоненте биле су камфор (24,8%), α -тујон (19,9%), 1,8-синеол (6,35%), виридифлорол (5,97%) (Couladis et al., 2002). Етарско уље из биљног материја такође пореклом из Сићевачке клисуре садржало је α -тујон (22,1%), 1,8-синеол (16,2%), камфор (5,4%), α -хумулен (11,1%), виридифлорол (5,7%) и β -кариофилен (6%) (Veličković et al., 2002). Уље надземних делова жалфије пореклом из околине Ниша садржало је α -тујон (28,2%), камфор (27,5%), 1,8-синеол (8,3%), борнеол (5,8%) и виридифлорол (4,3%) (Radulović et al., 2017). Aćimović и сарадници (2022) су пратили хемијски састав уља у 2019., 2020. и 2021. години и показали да проценат доминантних компоненти у уљу жалфије варира у односу на старост биљке (α -тујон (21,7%; 29,0%; 19,9%), камфор (17,7%; 19,6%; 15,8), β -тујон (12,3%; 13,2%; 13,3%) и 1,8-синеол (8,8%; 9,8%; 11,3%)). У овде испитаном уљу виридифлорол и борнеол нису детектовани, а проценат α -хумулена био је 5,1, док је проценат β -кариофилена био 2,9%.

Табела 7. Хемијски састав етарског уља *S. officinalis* (SO).

РТ ^а	РИ ^б	Компоненте	Класа	Метода идентификације ^г	
			SO		
2,29	801	Хексанал	1,7	О	РИ, МС, КоИ
2,71	847	(Z)-Салвен	0,2	М	РИ, МС
3,56	925	Трициклен	тр ^д	М	РИ, МС
3,57	926	α-Тујен	0,4	М	РИ, МС, КоИ
3,70	935	α-Пинен	3,6	М	РИ, МС, КоИ
3,93	951	Камфен	4,4	М	РИ, МС, КоИ
4,15	967	Хексанска киселина	тр	О	РИ, МС, КоИ
4,28	975	Сабинен	0,2	М	РИ, МС, КоИ
4,35	981	β-Пинен	2,2	М	РИ, МС, КоИ
4,49	990	β-Мирцен	0,5	М	РИ, МС, КоИ
5,14	1026	p-Цимен	1,2	М	РИ, МС, КоИ
5,22	1030	Лимонен	2,3	М	РИ, МС, КоИ
5,29	1033	Еукалиптол (син. ^б 1,8-синеол)	9,2	МО	РИ, МС, КоИ
5,80	1059	γ-Терпинен	0,2	М	РИ, МС, КоИ
6,46	1093	p-Цименен	тр	М	РИ, МС, КоИ
6,63	1102	Линалол	1,6	МО	РИ, МС, КоИ
6,85	1111	α-Тујон	29,7	МО	РИ, МС, КоИ
7,06	1119	β-Тујон	4,3	МО	РИ, МС, КоИ
7,26	1128	α-Камфоленал	тр	МО	РИ, МС
7,72	1148	Камфор	16,6	МО	РИ, МС, КоИ
8,18	1168	Изоборнеол	2,0	МО	РИ, МС, КоИ
8,92	1200	Миртенол	0,2	МО	РИ, МС, КоИ
10,06	1246	Карвон	0,2	МО	РИ, МС, КоИ
10,06	1246	Карвакрол метил етар	0,2	МО	РИ, МС, КоИ
10,29	1255	cis-Пиперитон епоксид	0,3	МО	РИ, МС
10,32	1256	Пиперитон	0,3	МО	РИ, МС
11,10	1288	Исборнил ацетат	1,5	МО	РИ, МС, КоИ
11,20	1292	p-Цимен-7-ол	0,1	МО	РИ, МС
11,25	1293	trans-Сабинил ацетат	0,6	МО	РИ, МС, КоИ
11,44	1301	Карвакрол	0,3	МО	РИ, МС, КоИ
11,83	1317	(2E,4E)-Декадиенал	0,4	О	РИ, МС
12,07	1327	Миртенил ацетат	тр	МО	РИ, МС, КоИ
13,11	1369	Пиперитенон оксид	0,2	МО	РИ, МС
14,46	1424	(E)-Кариофилен	2,9	С	РИ, МС, КоИ
14,93	1443	Аромадедрен	0,2	С	РИ, МС, КоИ
15,29	1458	α-Хумулен	5,1	С	РИ, МС
18,33	1587	Кариофилен оксид	1,6	СО	РИ, МС, КоИ
18,53	1596	Непознато ^е	2,6		
18,68	1602	Хумулен епоксид I	0,2	СО	РИ, МС
18,93	1614	Хумулен епоксид II	1,9	СО	РИ, МС
28,01	2060	Манол	0,5	СО	РИ, МС, КоИ

Укупно	99,8 (40) ^ж
Монотерпеноиди	82,6 (30)
Угљоводоници (М)	15,2 (12)
Оксигеновани деривати (МО)	67,4 (18)
Сесквитерпеноиди	12,5 (7)
Угљоводоници (С)	8,2 (3)
Оксигеновани деривати (СО)	4,3 (4)
Остало (О)	2,1 (2)
Недефинисано	2,6 (1)

^а Рт- Експериментално одређено ретенционо време (време задржавања) (у минутима) на колони DB-5MS.

^б РИ- Експериментално одређени ретенциони индекси на колони DB-5MS коинјекцијом серије n-алкана (C₇-C₃₀).

^в Вредности су резултати троструке анализе.

^г РИ- Индентитет компоненти одређен на основу подударана ретенционих индекса; МС- индентитет компоненти утврђен поређењем њихових масених спектра; КоИ- Индентитет компоненти додатно потврђен коинјекцијом аутентичног узорка.

^д тр- Трагови (< 0,05%).

^е син.- Синоним.

^с МС масени спектар (ЕИ, 70 eV; *m/z*, рел. инт., %): 222 (0,2), 204 (14,8), 189 (25), 176 (4,8), 161 (40,9), 147 (25,3), 133 (30,4), 119 (49,1), 105 (81,7), 91 (100), 79 (65,5), 67 (42,2), 55 (35,2), 43 (37,1), 41 (87,8).

^ж Број у заградама представља број једињења која припадају тој класи.

ГХ и ГХ-МС анализама комерцијалног уља *O. basilicum* идентификовано је 33 компоненти, што чини 99,9% детектабилних ГХ пикова. У оквиру класе монотерпена која је представљала 46,7% укупних компоненти, свега 2,9% припадало је монотерпенима, док су остале компоненте припадале њиховим оксигенованим дериватима. Две доминантне компоненте уља представљају фенилпропаноид (*E*)-анетол (39,4%) и ациклични монотерпенски алкохол, линалол (34,3%). Такође, међу доминантним компонентама су још један фенилпропаноид еугенол (5,8%) и трициклични сесквитерпен лонгифолен (6,2%).

Познато је да уља босиљка варирају у саставу и хемотипови се класификују према географском пореклу. Један од хемотипова је европски хемотип (Европа, САД и Африка), за који се сматра да има најпријатнији мирис и који као главне компоненте садржи 35-50% линалола и 15-25% метил чавикола. Други хемотип представља реинионски хемотип уља, пронађен на острвима Комори, Сејшелима, на Тајланду, у Африци, Вијетнаму и острву Реинион, карактерише се високим процентом метил чавикола (80% и више). Трећи хемотип уља, тропски хемотип, пореклом из Индије, Пакистана, Гватемале, Хаитија и Африке богат је метил цинаматом. Четврти хемотип уља босиљка пронађен је у Северној Африци, бившем СССР и деловима Азије, а као

главну компоненту садржи еугенол (Marotti et al., 1996; Radulović et al., 2013; Muráriková et al., 2017). У овде представљеном истраживању, тестирано уље босиљка садржи 34,3% линалола што је слично европском хемотипу (35%), али и значајно мањи проценат метил чавикола, свега 0,3%. Резултати анализе показали су да је тестирано уље богато другим фенилпропаноидом (*E*)-анетолом (39,4%), структурно и биохемијски сличним метил чавиколау. Иако је (*E*)-анетол честа компонента уља босиљка, обично је заступљен у малим процентима (5-6%) и само једно истраживање уља босиљка пореклом из Тогоа забележило је висок садржај овог фенилпропаноида (32,6%) (Koba et al., 2009). Исто уље је поред високе концентрације (*E*)-анетола садржало и висок проценат метил еугенола (42,3%), метил чавикола (10%) и свега 2,9% линалола. Етарска уља неких других врста рода *Ocimum*, попут *O. selloi* садрже (*E*)-анетол као доминантну компоненту која може чинити више од 50% уља (Silva et al., 2004). На основу литературних података за Србију и регион уочава се доминација етарских уља босиљка која као доминанте компоненте садрже линалол и метил чавикол (Politeo et al., 2007; Jelačić et al., 2011; Radulović et al., 2013; Beatović et al., 2015; Stanojević et al., 2017; Ilić et al., 2019; Gladikostić et al., 2023), затим линалол и 1,8-синеол (Radulović et al., 2013; Beatović et al., 2015; Sarić-Krsmanović et al., 2019; Ilić et al., 2022; Milenković et al., 2022) и линалол и еугенол (Pavlić et al., 2018; Ilić et al., 2019).

Табела 8. Хемијски састав етарског уља *O. basilicum* (OB).

РТ ^а	РИ ^б	Компоненте		Класа	Метода идентификације ^г
			<i>OB</i>		
3,70	935	α -Пинен	0,3	М	РИ, МС, КоИ
3,93	951	Камфенен	тр ^д	М	РИ, МС, КоИ
4,28	975	Сабинен	тр	М	РИ, МС, КоИ
4,35	981	β -Пинен	0,1	М	РИ, МС, КоИ
4,40	984	3-Октанон	0,2	О	РИ, МС, КоИ
4,49	990	β -Мирцен	0,5	М	РИ, МС, КоИ
4,78	1008	α -Фелеандрен	0,1	М	РИ, МС
5,14	1026	<i>p</i> -Цимен	0,2	М	РИ, МС, КоИ
5,22	1030	Лимонен	1,7	М	РИ, МС, КоИ
5,29	1033	Еукалиптол (син. ^б 1,8-синеол)	2,2	МО	РИ, МС, КоИ
5,80	1059	γ -Терпинен	тр	М	РИ, МС, КоИ
6,00	1070	Дихидромиценол	0,3	МО	РИ, МС
6,44	1092	Фенхон	0,6	МО	РИ, МС, КоИ

6,63	1102	Линалол	34,3	МО	РИ, МС, КоИ
7,35	1132	Дихидролиналол	0,3	МО	РИ, МС
8,32	1174	Ментол	0,5	МО	РИ, МС, КоИ
8,46	1180	Терпинен-4-ол	тр	МО	РИ, МС, КоИ
8,76	1193	α -Терпинеол	0,4	МО	РИ, МС, КоИ
8,92	1200	Изотерпинолен	тр	М	РИ, МС
8,94	1201	Метил чавикол (син. естрагол)	0,3	СМ	РИ, МС, КоИ
9,48	1222	<i>endo</i> -Фенхил ацетат	тр	МО	РИ, МС
9,61	1227	Цитронелол	1,9	МО	РИ, МС, КоИ
10,28	1254	(<i>Z</i>)-Анетол	тр	СМ	РИ, МС, КоИ
10,36	1257	<i>p</i> -Анисхалдехид	тр	СМ	РИ, МС, КоИ
11,21	1292	(<i>E</i>)-Анетол	39,4	СМ	РИ, МС, КоИ
12,67	1351	α -Терпинил ацетат	2,6	МО	РИ, МС, КоИ
12,73	1353	4-Терпиненил ацетат	0,8	МО	РИ, МС
12,90	1360	Еугенол	5,8	СМ	РИ, МС, КоИ
13,28	1375	Лонгициклен	0,1	С	РИ, МС
13,51	1384	(<i>E</i>)-Метил цинамат	1,0	СМ	РИ, МС, КоИ
14,16	1411	Лонгифолен	6,2	С	РИ, МС
14,46	1424	(<i>E</i>)-Кариофилен	0,1	С	РИ, МС, КоИ
15,29	1458	α -Хумулен	0,1	С	РИ, МС
		Укупно	99,9(33) ^с		
		Монотерпеноиди	46,7(22)		
		Угљоводоници (М)	2,9(10)		
		Оксигеновани деривати (МО)	43,9(12)		
		Сесквитерпеноиди	6,6(4)		
		Угљоводоници (С)	6,6(4)		
		Једињења шикиматног пута (СМ)	46,5(6)		
		Остало (О)	0,2(1)		

^а Рт- Експериментално одређено ретенционо време (време задржавања) (у минутима) на колони DB-5MS.

^б РИ- Експериментално одређени ретенциони индекси на колони DB-5MS коинјекцијом серије *n*-алкана (C₇-C₃₀).

^в Вредности су резултати троструке анализе.

^г РИ- Индентитет компоненти одређен на основу подударана ретенционих индекса; МС- индентитет компоненти утврђен поређењем њихових масених спектра; КоИ- Индентитет компоненти додатно потврђен коинјекцијом аутентичног узорка.

^д тр- Трагови (< 0,05%).

^ђ син.- Синоним

^е Број у заградама представља број једињења која припадају тој класи.

Анализом етарског уља ртањског чаја идентификовано је укупно 97 компоненти, што чини 98,3% састава уља. Компоненте су приказане у Табели 9. Класа монотерпена чини 87%, а од тога 67,7% чине оксигеновани деривати. Сесквитерпенима припада свега 10,1%, где 7,1% чине оксигеновани деривати. Доминантне компоненте уља чине монотерпенски феноли карвакрол (24,3%) и тимол (15,5%), затим следе *p*-цимен (12,2%), *O*-метил карвакрол (8,2%) и борнеол (6%). Наше уље показало је сличан састав уљу добијеног хидродестилацијом из сувог биљног материјала прикупљеног у фази цветања на планини Ртањ, близу Соко Бање (карвакрол 26,6%, тимол 16,7%, *p*-цимен 7,3%, карвакрол метил етар (*O*-метил карвакрол) 4,5 и борнеол 5,6) (Ђорђевић et al., 2021). Досадашњи литературни подаци указују на то да хемијски састав уља *S. montana* варира у концентрацији али и типу доминантних компоненти зависно од присуства различитих хемотипова, локације али и услова средине у којима биљка расте (Mastelić & Jerković, 2003; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Kundaković et al., 2014; Ђорђевић et al., 2021). На основу литературе, овде анализирано уље ртањског чаја богато карвакролом припада хемотипу А (Serrano et al., 2011; Elgndi et al., 2017). Као главне компоненте овог уља најчешће се могу наћи карвакрол у распону од 5%-69%, линалол (1%-62%), тимол (3,8-46%), γ -терпинен (1%-31%) и *p*-цимен (3%-32,3%) (Milos et al., 2001; Slavkovska et al., 2001; Skočibušić & Bezić, 2004; Skočibušić & Bezić, 2004b; Bezić, 2004; Bezbradica et al., 2005; Ćavar et al., 2008; Vidić et al., 2009; Damjanović-Vratnica et al., 2011; Nikolić et al., 2014; Ćavar et al., 2014; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Kundaković et al., 2014; Hajdari et al., 2016; Bojović et al., 2018; Pavlić et al., 2018; Matković et al., 2018; Šojić et al., 2019; Aćimović et al., 2019; Ђорђевић et al., 2021; Aćimović et al., 2022; Šojić et al., 2023; Kulić et al., 2023).

Табела 9. Хемијски састав етарског уља *S. montana* (SM).

РИ ^а	РИ ^б	Компоненте	Класа	Метода идентификације ^г	
			SM		
801	801	Хексанал	тр ^д	ФАД	РИ, МС, КоИ
828	827	Фурфурал	тр	ФАД	РИ, МС, КоИ
846	844	(E)-2-Хексанал	тр	ФАД	РИ, МС
927	924	α -Тујен	0,1	М	РИ, МС
937	932	α -Пинен	0,3	М	РИ, МС, КоИ
938	946	Камфен	0,4	М	РИ, МС, КоИ
969	952	Бензоалдеhid	тр	СМ	РИ, МС, КоИ
972	974	1-Октен-3-ол	1,2	ФАД	РИ, МС, КоИ
984	974	β -Пинен	0,1	М	РИ, МС, КоИ
988	988	Мирцен	0,7	М	РИ, МС, КоИ
996	988	3-Октанол	0,1	МО	РИ, МС, КоИ
1003	1004	(Z)-3-Хексен-1-ил ацетат	тр	О	РИ, МС, КоИ
1010	1002	α -Феландрен	тр	М	РИ, МС
1020	1014	α -Терпинен	0,8	М	РИ, МС, КоИ
1028	1020	<i>p</i> -Цимен	12,2	М	РИ, МС, КоИ
1032	1024	Лимонен	1,1	М	РИ, МС, КоИ
1036	1026	Еукалиптол (син. ^е 1.8-синеол)	1,0	МО	РИ, МС, КоИ
1045	1044	(E)- β -Оцимен	0,1	М	РИ, МС
1060	1054	γ -Терпинен	3,1	М	РИ, МС
1072	1067	<i>cis</i> -Линалол оксид (фураноид)	0,2	МО	РИ, МС, КоИ
1079	1079	1-Нонен-3-ол	тр	МО	РИ, МС
1088	1084	<i>trans</i> -Линалол оксид (фураноид)	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1089	1086	Терпинолен	0,3	М	РИ, МС
1094	1089	<i>p</i> -Цименен	0,1	М	РИ, МС
1100	1095	Линалол	2,0	МО	РИ, МС, КоИ
1104	1110	1-Октен-3-ил ацетат	0,3	МО	РИ, МС, КоИ
1111	1101	α -Тујен	0,1	МО	РИ, МС, КоИ
1122	1112	β -Тујон	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1125	1122	<i>trans-p</i> -Мента-2.8-диен-1-ол	тр	МО	РИ, МС
1128	1121	<i>cis-p</i> -Мент-2-ен-1-ол	0,2	МО	РИ, МС
1146	1138	<i>trans-p</i> -Мент-2-ен-1-ол	тр	МО	РИ, МС
1146	1135	<i>trans</i> -Пинокарвеол	0,3	МО	РИ, МС
1152	1141	Камфор	1,3	МО	РИ, МС, КоИ
1159	1148	Ментон	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1168	1160	Пинокарвон	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1178	1165	Борнеол	6,0	МО	РИ, МС, КоИ
1185	1174	Терпинен-4-ол	3,1	МО	РИ, МС, КоИ
1190	1179	<i>p</i> -Цимен-8-ол	0,7	МО	РИ, МС
1199	1186	α -Терпинеол	0,8	МО	РИ, МС, КоИ
1202	1191	<i>cis</i> -Дихидро карвон	0,3	МО	РИ, МС

1215	1207	<i>trans</i> -Пиперитол	тр	МО	РИ, МС
1220	1204	Вербенон	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1225	1215	<i>trans</i> -Карвеол	0,1	МО	РИ, МС
1229	1223	Цитронелол	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1231	1232	<i>O</i> -Метил тимол	0,5	МО	РИ, МС, КоИ
1233	1235	Исоборнил формат	тр	МО	РИ, МС
1242	1241	<i>O</i> -Метил карвакрол	8,2	МО	РИ, МС, КоИ
1247	1233	Пулегон	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1248	1238	Кумин алдехид	0,3	МО	РИ, МС
1252	1239	Карвон	0,3	МО	РИ, МС, КоИ
1254	1249	Гераниол	0,8	МО	РИ, МС, КоИ
1266	1266	<i>trans</i> -Аскаридол гликол	тр	О	РИ, МС
1274	1264	Гераниал	тр	МО	РИ, МС
1285	1283	Исотимол	тр	МО	РИ, МС
1287	1284	Борнил ацетат	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1295	1289	Тимол	15,5	МО	РИ, МС, КоИ
1306	1298	Карвакрол	24,3	МО	РИ, МС
1347	1349	Тимил ацетат	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1349	1346	α -Терпинил ацетат	тр	МО	РИ, МС
1352	1345	α -Кубебен	тр	С	РИ, МС
1358	1359	Нерил ацетат	0,1	МО	РИ, МС, КоИ
1367	1370	Карвакрил сцетат	тр	МО	РИ, МС, КоИ
1378	1379	Геранил ацетат	1,2	МО	РИ, МС, КоИ
1381	1374	α -Копаен	0,2	С	РИ, МС
1390	1387	β -Бурбонен	0,4	С	РИ, МС
1393	1389	β -Елемен	тр	С	РИ, МС
1414	1409	α -Гурјумен	тр	С	РИ, МС
1427	1417	(<i>E</i>)-Кариофилен	2,6	С	РИ, МС, КоИ
1436	1430	β -Копаен	0,1	С	РИ, МС
1446	1439	Аромадендрен	0,4	С	РИ, МС
1462	1452	α -Хумулен	0,1	С	РИ, МС, КоИ
1468	1458	<i>allo</i> -Аромадендрен	тр	С	РИ, МС, КоИ
1480	1478	γ -Муролен	0,4	С	РИ, МС
1488	1484	Гермакрен D	0,5	С	РИ, МС, КоИ
1496	1489	β -Селинен	тр	С	РИ, МС
1498	1496	Виридифлорен	0,4	С	РИ, МС
1511	1505	β -Бисаболен	0,9	С	РИ, МС
1519	1513	γ -Кадинен	0,3	С	РИ, МС
1524	1522	δ -Кадинен	0,5	С	РИ, МС
1527	1521	<i>cis</i> -Каламененен	тр	С	РИ, МС
1543	1537	α -Кадинен	тр	С	РИ, МС
1548	1544	α -Калакорен	тр	С	РИ, МС
1553	1548	Елемол	тр	С	РИ, МС
1585	1577	Спатуленол	1,0	СО	РИ, МС, КоИ
1591	1582	Кариофилен оксид	1,8	СО	РИ, МС, КоИ
1601	1589	4(14)-Салвиален-1-оне	тр	СО	РИ, МС
1611	1607	β -Оплопенон	тр	СО	РИ, МС
1618	1608	Хумулен епоксид II	тр	СО	РИ, МС

1623	1619	Ториленол	тр	СО	РИ, МС
1636	1627	1- <i>epi</i> -Кубенол	тр	СО	РИ, МС
1645	1639	(3 <i>Z</i>)-Кариофила-3.8(13)- диен-5 β -ол	0,1	СО	РИ, МС
1649	1640	Т-Кадинол	тр	С	РИ, МС
1651	1640	<i>epi</i> - α -Муролол (син. τ - муролол)	тр	СО	РИ, МС
1663	1652	α -Кадинол	0,3	С	РИ, МС
1678	1668	14-Хидрокси-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)- кариофилен	0,1	СО	РИ, МС
1681	1675	Кадален	тр	С	РИ, МС
1698	1700	Аморфа-4.9-диен-2-ол ^е	тр	СО	РИ, МС
		Укупно:	98,3		
		Монотерпеноиди (угљоводоници) (М)	19,3		
		Монотерпеноиди (оксигеновани) (МО)	67,7		
		Сесквитерпеноиди (угљоводоници) (С)	7,1		
		Сесквитерпеноиди (оксигеновани) (СО)	3,0		
		Масне киселине и једињења изведена из метаболизма масних киселина (FAD)	1,2		
		Једињења шикиматног пута (СМ)	тр		
		Остало (О)	тр		

^а Експериментално одређени ретенциони индекси на колони ДБ-5МС према серији *n*-алкана (C7-C40).

^б Литературне вредности ретенционих индекса преузете из Adams (2007).

^в Вредности су резултати троструке анализе.

^г РИ- Индентитет компоненти одређен на основу подударача ретенционих индекса; МС- индентитет компоненти утврђен поређењем њихових масених спектра; КоИ- Индентитет компоненти додатно потврђен коинекцијом аутентичног узорка

^д тр-Компоненте присутне у траговима (< 0.05%).

^ђ син-Синоним

^еКорекциони стереоизомери нису детерминисани.

4.2. Осетљивост изолата *P. aeruginosa* на антибиотике

Како би се одредила осетљивост на антибиотике, клинички изолати *P. aeruginosa* тестирани су на спектар антибиотика укључујући амикацин, гентамицин, пиперацилин + тазобактам, цiproфлорксацин, меропенем, имипенем, цефтазидим, цефепим и ампицилин. Тестирано је укупно 29 изолата различитог порекла (узорак урина, брис грла, брис ока, брис уха, брис ране, брис коже) на спектар антибиотика и резултати осетљивости приказани су у Табели 10.

Табела 10. Осетљивост изолата *P. aeruginosa* на спектар антибиотика утврђена антибиограм тестом

Бр. изолата	АМК	ГЕН	ЦФПМ	ЦФТ	ИМП	МЕР	ЦПР	ТЗП	АМП
1	С	С	С	С	С	С	С	С	С
2	С	С	С	С	С	С	С	С	С
3	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	С	Р
4	С	Р	С	С	С	С	Р	С	С
5	С	С	С	С	С	С	С	С	С
6	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
7	Р	Р	Р	Р	Р	С	Р	Р	Р
8	С	С	С	С	С	С	С	С	С
9	С	С	Р	Р	Р	Р	С	Р	Р
10	С	С	С	С	С	С	С	С	С
11	С	С	С	С	С	С	С	С	С
12	С	С	С	С	С	С	С	С	С
13	С	Р	Р	Р	Р	С	С	С	С
14	С	С	С	С	С	С	С	С	С
15	С	С	С	С	С	С	С	С	Р
16	С	С	С	С	С	С	С	С	С
17	С	С	С	С	С	С	С	С	С
18	С	С	С	С	С	С	Р	С	С
19	С	Р	С	С	С	С	С	С	С
20	С	С	С	С	С	С	С	С	С
21	С	С	С	С	С	С	С	С	С
22	С	С	С	С	С	С	С	С	С
23	С	С	Р	С	С	С	Р	С	С
24	С	С	С	С	С	С	Р	С	С
25	С	С	С	С	С	С	Р	С	С
26	С	С	С	С	С	С	С	С	С
27	С	С	С	С	С	С	Р	С	С
28	С	С	Р	С	С	С	С	С	С
29	С	С	С	С	С	С	С	С	С

амикацин (АМК), гентамицин (ГЕН), цефепим (ЦФПМ), цефтазидим (ЦФТ), имипенем (ИМП), меропенем (МЕР), цiproфлорксацин (ЦПР), пиперацилин-тазобактам (ТЗП), ампицилин (АМП)

Антибиограм је показао да је један изолат (бр. 6) био резистентан на све тестиране антибиотике, док је петнаест изолата (51,72%) било осетљиво на све тестиране антибиотике. Са друге стране, шест изолата (3, 4, 7, 9, 13, 23) (20,69%) показала су резистенцију на два и више антибиотика. Изолат 15 показао је резистенцију само на ампицилин, изолати 18, 24, 15 и 17 показали су резистенцију само на ципрофлоксацин, изолат 19 на гентамицин, а изолат 26 на цефепим.

Уочљива је чињеница да је ципрофлоксацин показао најслабије дејство и није ихибирао раст 9 од укупно 29 тестираних изолата, док се амикацин показао најефикаснијим антибиотиком, где је само 3 изолата било резистентно на овај антибиотик.

Резистенција сојева *P. aeruginosa* уочена је на пеницилине/цефалоспорине, карбопене, аминогликозиде и флуорокиноле (Векеле et al., 2015). Током периода истраживања од 2009-2015 у Србији је забележена је резистенција изолата *P. aeruginosa* на трећу генерацију цефалоспорина, карбопене и аминогликозиде (Ђорђевић et al., 2017). Значајно повећање резистентности изолата *P. aeruginosa* у Србији примећено је на цефтазидим, пиперацилин/тозобактам и флуорокинолоне током периода од 2013-2020 године (Томић et al., 2023). У овде приказаном истраживању 10,24% изолата је било резистентно на амикацин, 10,24% на меропенем, 17,24 на имипенем и цефтазидим, 20,68% на гентамицин, 24,14% на цефепим, 31,03% на ципрофлоксацин. Сличне резултате добили су и Милојковић и сарадници (2020) за изолате различитог порекла (урин, брис грла, брис уха, брис ране и вагинални брис) из јужне Србије сакупљане током периода 2013-2015, где је 8,51% било резистентно на имипенем, 15,96% на меропенем, 29,79% на цефтазидим, 24,47% на цефепим, 39,36% изолата било је резистентно на гентамицин, а 34,04% на ципрофлоксацин. На основу овога може се уочити благи пораст резистенције ових сојева на подручју нашег истраживања, које је било и подручје анализе Милојковић и сарадника (2020), уз напомену да је свакако за овакву анализу потребан знатно већи број изолата. Међутим, значајно већа резистенција уочена је у истраживању спроведеном у Индији, где је међу тестираним изолатима *P. aeruginosa* различитог порекла (урин, брис коже и спутум) 67,86% је било резистентно на гентамицин, 50% на амикацин, 67,86% на цефтазидим, 69,64% резистентно на цефепим и 69,64 на ципрофлоксацин (Јавија et al., 2008). Векеле и сарадници (2015) су испитивали осетљивост 36 изолата пореклом из узорака урина (Етиопија) и показали да су сви изолати (100%) били осетљиви на ципрофлоксацин, док је 86,12% (31 изолат)

било осетљиво на гентамицин. Ово није случај у овде приказаном истраживању, где је од 9 изолата пореклом из узорака урина, 5 изолата (55,55%) показало је резистенцију на ципрофлоксацин и гентамицин. Zeb и сарадници (2017) показали су да је 75% изолата различитог порекла (крв, урин, спутум) било осетљиво на имипенем, а 70% на амикацин. Још једно истраживање спроведено у Бангалдешу показује сличне резултате, где је 100% клиничких изолата било осетљиво на имипенем и меропенем, а 75% на амикацин (Bhuiya et al., 2018). Са друге стране, истраживање новијег датума за изолате из Саудијске Арабије показује да је 77,8% и 61% изолата различитог порекла (крв, урин, рана) било резистентно на имипенем и меропенем, док је 36% показало резистенцију на цефтазидим, а само 11,3% на ципрофлоксацин (Alshammari et al., 2023). Глобално посматрано највећи број изолата *P. aeruginosa* показује резистенцију на азтреонам (55,7% тестираних изолата), затим на левофлоксацин (42,2%) и меропенем (22,5%). На основу свега наведеног, може се закључити да су овако разноврсни обрасци резистенције вероватно последица различитих препоручених антибиотика за терапију инфекција овом врстом, а које се разликују између земаља. У једном од новијих истраживања, уочена је већа резистенција изолата *P. aeruginosa* на меропенем у Африци (34,65%) и Азији (31,4%) него у Америци (11,3%) и Европи (6,85%) (Nasrin et al., 2022), што је највероватније последица чешће употребе овог антибиотика за третман инфекција изазваних наведеним патогеном.

4.3. Продукција биофилма

Ради одређивања способности продукције биофилма клиничких изолата *P. aeruginosa*, сви изолати су инокулисани и инкубирани 24 h на 37 °C у триптон соја бујону са додатком 0,5% глукозе.

Након анализе продукције биофилма, шеснаест изолата окарактерисани су као јаки продуценти биофилма, једанаест умерени, један слаб продуцент, док један сој није показао способност продукције биофилма. Резултати продукције биофилма изолата приказани су у Табели 11.

Табела 11. Способност продукције биофилма изолата *P. Aeruginosa*

Изолати	Способност продукције биофилма
Бр. 1	Јак продуцент
Бр. 2	Јак продуцент
Бр. 3	Умерени продуцент
Бр. 4	Умерени продуцент
Бр. 5	Умерени продуцент
Бр. 6	Умерени продуцент
Бр. 7	Умерени продуцент
Бр. 8	Умерени продуцент
Бр. 9	Умерени продуцент
Бр. 10	Умерени продуцент
Бр. 11	Умерени продуцент
Бр. 12	Умерени продуцент
Бр. 13	Умерени продуцент
Бр. 14	Слаб продуцент
Бр. 15	Није продуцент
Бр. 16	Јак продуцент
Бр. 17	Јак продуцент
Бр. 18	Јак продуцент
Бр. 19	Јак продуцент
Бр. 20	Јак продуцент
Бр. 21	Јак продуцент
Бр. 22	Јак продуцент
Бр. 23	Јак продуцент
Бр. 24	Јак продуцент
Бр. 25	Јак продуцент
Бр. 26	Јак продуцент
Бр. 27	Јак продуцент
Бр. 28	Јак продуцент
Бр. 29	Јак продуцент

4.4. Продукција биофилма након третмана уљима босиљка и жалфије у фази пре адхезије- скрининг студија

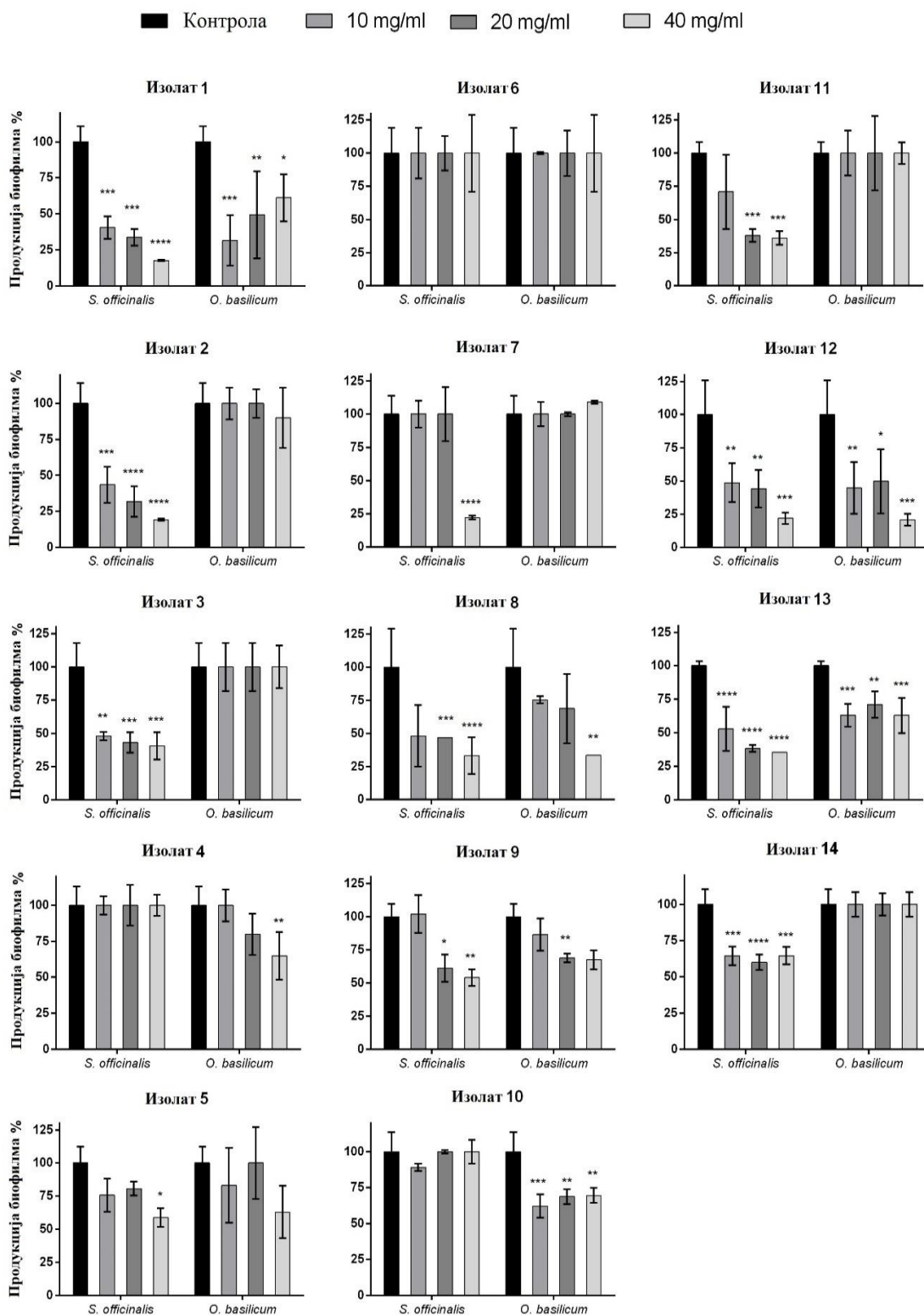
С обзиром на чињеницу да је утицај етарских уља на продукцију биофилма клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa* недовољно испитан, одлучено је да се најпре уради скрининг експеримент који би показао да ли одабрана уља имају неки ефекат на продукцију биофилма и да се види да ли постоји веза између продукције биофилма и осетљивости на антибиотике и уља. За овај део експеримента одабрана су комерцијална уља босиљка и жалфије јер до сада није испитиван њихов ефекат на биофилм *P.*

aeruginosa. Како би испитали утицај ових уља на адхезију ћелија и формирање биофилма, уља су додата у самом старту култивације бактерија (уља и бактерије додати су у подлогу у исто време) и резултати су приказани на Слици 4. За испитивање утицаја уља у овом делу експеримента одабрано је првих петнаест изолата због варијабилности у продукцији биофилма код различитих сојева. С обзиром на познату чињеницу да бактерије у биофилмовима развијају већу резистенцију, тестиране су високе концентрације уља (10-40 mg/ml).

Након третмана уљима босиљка и жалфије у различитим концентрацијама, продукција биофилма два јака продуцента (изолата 1 и 2) и слабог продуцента (изолата 14) значајно је редукована у случају примене уља жалфије (чак 64% код изолата 14) (Слика 4). Са друге стране, ови изолати показали су резистенцију (продуковали су исту количину биофилма као и у контролном третману, или редуција није била статистички значајна) након примене уља босиљка. Битно је истаћи да су наведени изолати били осетљиви на све тестиране антибиотике.

Од 11 умерених продуцената 81,8% показало је осетљивост након третмана уљем жалфије, док је уље босиљка довело до смањења продукције биофилма код 63,6% изолата. Неки од изолата показали су осетљивост на оба тестирана уља. Присутност уља жалфије у подлози довела је до значајне инхибиције продукције биофилма (40% до 49%) изолата 3, док је изолат 4 показао резистенцију на исто уље. Са друге стране, уље босиљка инхибирало је продукцију биофилма код изолата 4 и то 20% при концентрацији од 20 mg/ml и 35% при концентрацији од 40 mg/ml. Продукција биофилма код изолата 5 смањена је за 43% након апликације уља босиљка и за 19-42% након примене уља жалфије. Мултирезистентни изолати, а умерени продуценти, 6 и 7 показали су слабу осетљивост на оба тестирана уља. У случају изолата 6 уље босиљка није редуковало продукцију биофилма. Код изолата 7 уочена је редуција биофилма (78%) само након третмана највећом концентрацијом уља жалфије.

Са друге стране, у случају изолата 8, 10, 11, 12 који су показали осетљивост на антибиотике уочено је да ефекат оба уља на редуцију биофилма није занемарљив. У случају изолата 8 уочена је значајна редуција применом највиших концентрација оба уља. Изолат 9 окарактерисан као умерени продуцент са резистенцијом на 4 антибиотика, показао је осетљивост на оба уља, док је изолат 10 био осетљив на уље босиљка, а резистентан на уље жалфије. Највећу активност на продукцију биофилма показала су уља у случају изолата 12 где је уочена редуција 50 до 80% након третмана босиљком, а 52% до 79% након третмана уљем жалфије.



Слика 4. Редукција биофилма изолата *P. aeruginosa* након третмана уљима *Ocimum basilicum* и *Salvia officinalis* фази пре адхезије ћелија. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey post-hoc тестом. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Pseudomonas aeruginosa познат је као веома проблематичан патоген у погледу његове контроле антибиотицима и осталим антимикуробним агенсима. Његова резистенција повезана је са великим бројем фактора попут ниске ћелијске пропустљивости, ефлукс пумпи одговорних за ефикасно уклањање молекула антибиотика, генетичке основе повезане са многим механизмима резистенције удруженим са способношћу продукције биофилма (Lambert, 2002). Познато је да биофилмови могу бити и до 100 пута резистентнији у поређењу са планктонским ћелијама истог соја. Због високе резистенције соја *P. aeruginosa* чак и у планктонској форми, тестиране су високе концентрације уља босиљка и жалфије како би се испитала њихова антибиофилм активност.

Пронађено је да етарско уље жалфије показује већу активност чак и на биофилмове мултирезистентних изолата 3, 7, 9 и 13 и јаких продуцента 1 и 2, што није био случај са уљем босиљка (осим у случају изолата 13 чији је биофилм значајно редукован овим уљем). Биофилм два јака продуцента (1 и 2) пореклом из бриса грла значајно је редукован након примене уља жалфије, што оправдава чињеницу да се ова биљка традиционално користи у третману инфекција грла.

Претходно је показано да етарска уља три врсте жалфије (*Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis* и *Salvia sclarea*) снижавају ефлукс тетрациклина и снижавају експресију *tet(K)* гена код клиничких изолата *Staphylococcus epidermidis* резистентних на тетрациклин (Chovanová et al., 2015). Када анализирамо резултате добијене испитивањем резистенције на антибиотике и осетљивости изолата на етарска уља може се приметити да изолати који су показали резистенцију на уља показују и резистенцију на гентамицин. Гентамицин припада аминогликозидној групи антибиотика чији је механизам дејства инхибирање синтезе протеина везивањем за 30S субјединицу рибозома (Lambert, 2002). Познато је да се овај антибиотик везује за А субјединицу рибозома (Yoshizawa et al., 1998) због чега се може претпоставити да неке компоненте уља имају, макар делимично исти механизам деловања, који има синергистичку интеракцију са механизмом деловања на ћелијски зид других компоненти. Меропенем и имипенем припадају групи карбапенемских антибиотика (β -лактамских антибиотика) који делују тако што утичу на синтезу ћелијског зида. Изолати у овом истраживању показали су различиту осетљивост на ова два антибиотика, што може бити објашњено различитим начинима продора у ћелију. Познато је да ћелијски зид *P. aeruginosa* представља значајну баријеру за продор различитих антибиотика. Мали молекули укључујући бета лактаме и кинолоне могу

проћи само преко малих поринских канала. *Pseudomonas aeruginosa* поседује различите порине међу којима је *oprD* канал одговоран за транспорт имипенема, што је доказано јер губитак ових канала изазива резистенцију на имипенем (Yoshizawa et al., 1998; Lambert, 2002). Са друге стране, резистенција на меропенем није примећена у овим експериментима (код *oprD* мутираних ћелија), што указује да меропенем има други начин уласка у ћелију.

Као наставак претходног истраживања које представља скрининг студију у којој је потврђен ефекат комерцијалних етарских уља босиљка и жалфије на формирање биофилма 15 клиничких изолата *P. aeruginosa*, следећа истраживања имала су за циљ одређивање антимикуробног потенцијала ових уља али и уља ртањског чаја, одређивање њиховог потенцијала као антивирулентних фактора и утицај на различите фазе формирања биофилма. За ове тестове одабрано је 14 изолата због веће продукције биофилма (сви изолати окарактерисани као јаки продуценти) и веће осетљивости на антибиотике.

4.5. Антимикробна активност комерцијалних етарских уља

Антибактеријска активност тестираних уља босиљка, жалфије, ртањског чаја и позитивне контроле антибиотика ципрофлоксацина одређена је микродилуционом методом и резултати су приказани у Табели 12. Уља босиљка и жалфије показала су активност у опсегу 5-20 mg/ml, док је уље ртањског чаја било активно у опсегу од 0,63 до 10 mg/ml зависно од тестираног изолата. МИК вредности антибиотика ципрофлоксацина кретале су се у опсегу 0,01-25 µg/ml.

На уље босиљка најсензитивнији су били сојеви 8, 11 и 12, где је минимална инхибиторна концентрација била 5 mg/ml. Раст осталих изолата био је инхибиран при концентрацији од 10 mg/ml, осим изолата 2 где је минимална инхибиторна концентрација била 20 mg/ml и који се показао као најрезистентнији на уље босиљка.

Етарско уље жалфије се такође показало активним при концентрацијама у опсегу 5-20 mg/ml. Највећа активност овог уља примећена је у случају изолата 12. Највећа концентрација од 20 mg/ml била је неопходна за инхибирање раста изолата 3, 4 и 6. Остали изолати били су инхибирани при концентрацији од 10 mg/ml.

Табела 12. Антимикробна активност комерцијалних етарских уља и антибиотика
ципрофлуксацина

Изолати	Порекло	<i>O. basilicum</i> МИК (mg/ml)	<i>S. officinalis</i> МИК (mg/ml)	<i>S. montana</i> МИК (mg/ml)	Ципрофлуксацин МИК (µg/ml)
Бр. 1	Брис грла	10	10	5,00	3,52
Бр. 2	Брис грла	20	10	2,50	0,40
Бр. 3	Узорак урина	10	20	2,50	25,00
Бр. 4	Узорак урина	10	20	1,41	3,12
Бр. 5	Узорак урина	10	10	2,50	1,07
Бр. 6	Узорак урина	10	20	2,50	0,02
Бр. 7	Брис коже	10	10	10,00	1,95
Бр. 8	Брис ока	5	10	0,63	25,00
Бр. 9	Брис ока	10	10	5,00	18,23
Бр. 10	Брис ране	10	10	2,50	18,23
Бр. 11	Брис ране	5	10	5,00	2,34
Бр. 12	Брис ране	5	5	10,00	18,23
Бр. 13	Брис уха	10	10	1,25	1,56
Бр. 14	Брис коже	10	10	1,41	1,56

МИК-минимална инхибиторна концентрација приказана у mg/ml и µg/ml

Етарско уље ртањског чаја показало је највећу ефикасност у случају изолата 8 где је минимална инхибиторна концентрација била 0,63 mg/ml, док је концентрација од 1,25 mg/ml била потребна за инхибирање раста изолата 13. Као најрезистентнији изолати на уље ртањског чаја показали су се изолати 7 и 12, чији је раст био инхибиран при концентрацији од 10 mg/ml. Концентрација од 5 mg/ml инхибирала је раст изолата 1, 9 и 11.

На активност етарских уља утичу њихов састав, функционалне групе присутне на активним компонентама, као и њихове синергистичке реакције (Dorman & Deans, 2000). Захваљујући хидрофобности, етарска уља и компоненте реагују са липидима у ћелијској мембрани и мембранама митохондрија мењајући њихову пермеабилност. Као последица интеракције наступа ћелијска смрт услед ослобађања јона и молекула из ћелија (Radulović et al., 2013). Са друге стране неке компоненте етарских уља интерагују са ефлуке пумпама, мењајући на тај начин активност пумпи, што као последицу може имати промењену осетљивост ћелије на антибиотике (Lorenzi et al., 2009). Механизми деловања етарских уља зависе не само од састава етарског уља већ и од врсте микроорганизма који се третира. Етарска уља имају већу активност на Грам позитивне

бактерије у односу на Грам негативне. Отпорност Грам негативних бактерија објашњава се присуством спољашње липополисахаридне мембране, која ограничава продор хидрофобних компоненти. Са друге стране, Грам позитивне бактерије немају спољашњу мембрану већ дебео пептидогликански ћелијски зид мале густине кроз који лако дифундују мали молекули. Осим тога пептидогликански зид састоји се од липотејхојне киселине, чији липофилни крајеви везују хидрофобне молекуле (Chouhan et al., 2017).

Претходна истраживања показале су да се минималне инхибиторне концентрације уља босиљка на сојеве *P. aeruginosa* крећу у опсегу од 20 mg/ml до 40 mg/ml (Hammer et al., 1999; Niculae et al., 2009). Међутим ова два истраживања нису испитивала хемијски састав тестираног уља босиљка што би нам омогућило да упоредимо и повежемо специфични хемијски састав уља са активношћу. Šovljanski и сарадници (2022) показали су да етарска уља босиљка са високим садржајем линалола (40,5-75,5%) нису имала активност на сој *P. aeruginosa*. У другом истраживању етарско уље *O. basilicum* (линалол 57%; еугенол 19,2%) такође није показало активност на сој *P. aeruginosa* CRBIP 19.249, (Bassolé et al., 2010). Етарска уља биљака гајених у различитим условима (светлост и сенка) такође нису показала значајно повећање зоне инхибиције у односу на тестирани антибиотик пеницилин (Пић et al., 2021). Етарско уље босиљка са линалолом (55,2%), 1,8-синеолом (8,8%) и α -trans бергамотеном (7%) као доминантним компонентама показало је активност на сојеве *P. aeruginosa* ATCC 25853 и клинички изолат при МИК концентрацији од 1,024 mg/ml (Silva et al., 2016). Ђорђевић и сарадници (2022) испитивали су ефекат три уља босиљка ЕО1 (линалол 30,3%; метил чавикол 24,2%; 1,8-синеол 4%), ЕО2 (линалол 51,2%; ери- α -кадинол 7,3; 1,8-синеол 6,6%) и ЕО3 (линалол 58,2%; ери- α -кадинол 7,5%; 1,8-синеол 4,2%) добијених различитим методама изолације на сој *P. aeruginosa* ATCC 27853 и показали су минималне инхибиторне концентрације 12,93 mg/ml, 12,93 mg/ml и 14,23 mg/ml. Када упоредимо резултате истраживања Bassolé и сарадника (2010) и Ђорђевић и сарадника (2022) са резултатима овог истраживања, уочавамо већу активност (МИК 5-20 mg/ml) комерцијаног уља босиљка (*E*-анетол 39,4%; линалол 34,3%; еугенол 5,8%), где у прилог бољој активности иде и чињеница да је уље испитивано на клиничке изолате. Hussain и сарадници (2008) су испитивали разлике у антимикробној активности етарских уља *O. basilicum* добијених сакупљањем биљног материјала током различитих годишњих доба и повезали су резултате са разликама у хемијском саставу уља. Најниже минималне инхибиторне концентрације уља на сојеве *S. aureus*, *B. subtilis* и *E. coli* кретале су се у опсегу од 0,8 до 2,6 mg/ml. Резултати су указали на високу активност уља изолованог из материјала

прикупљеног у јесен и зиму, што је повезано са њиховим високим садржајем линалола (садржај у свим уљима у опсегу од 56,7 до 60,6%) у односу на уља добијена у лето и пролеће. Истраживања која су испитивала ефекат уља босиљка и његових доминантних компоненти потврдиле су да линалол при концентрацији од 6,7 mg/ml и еугенол (2,1 mg/ml) поседују антимикробни ефекат на сој *P. aeruginosa* CRBIP 19.249 (Bassolé et al., 2010). Такође је утврђено да линалол, метил чавикол, еугенол, тимол и *p*-цимен поседују антимикробну активност (Park et al., 2012; Herman et al., 2016) и у већини случајева механизам деловања је оштећење ћелијског зида и промена пропустљивости мембране (Oyedemi et al., 2009; De Paula et al., 2014). На основу овога, добијена активност се може приписати специфичном саставу и заступљености наведених компоненти у овде тестираном етарском уљу.

Хемијски састав етарског уља жалфије је релативно константан, а истраживања показују да су α -тујон, камфор и 1,8-синеол доминантне компоненте (Radulescu et al., 2004; Delamare et al., 2007; Raal et al., 2007; Damjanovic-Vratnica et al., 2008; Aćimović et al., 2022; Gladikostić et al., 2023). Претходно је утврђено да је етарско уље жалфије инхибирало активност изолата *P. aeruginosa* из животињских узорака при минималној инхибиторној концентрацији од 40 mg/ml (Niculae et al., 2009). У истраживању Adrar и сарадника (2016) тестирано уље жалфије инхибирало је раст изолата *P. aeruginosa* при МИК од 7,49 mg/ml. Међутим поменута истраживања (Niculae et al., 2009; Adrar et al., 2016) нису испитивала хемијски састав уља па је проблематично поредити резултате са нашим комерцијалним уљем. Hammeг и сарадници (1999) су показали да је уље жалфије било неактивно при највишој тестираној концентрацији од 20 mg/ml, а ефекат овог уља на ћелије *P. aeruginosa* изостао је и у истраживањима Delamare и сарадника (2007) и Воџин и сарадника (2007). Damjanović-Vratnica и сарадници (2008) су такође уочили неактивност тестираног уља жалфије на изолат *P. aeruginosa*, а исте резултате показало је и истраживање El-Hosseiny и сарадника (2014) на сој *P. aeruginosa* ATCC 9027. Aćimović и сарадници (2022) су испитивали ефекат уља жалфије добијеног 2019, 2020 и 2021 године, где је заступљеност α -тујона била 19,8, 13,4 и 13,9%; камфора 42,8, 49,6, и 42,4% и 1,8-синеола 8,8, 9,8 и 11,3% и показали да су уља била неактивна у свим испитиваним концентрацијама на изолат *P. aeruginosa*. Споменуто уља имају различити проценат заступљености главних компоненти у односу на комерцијално уље жалфије тестирано у овом истраживању (α -тујон 29,7%; камфор 16,6% и 1,8-синеол 9,2%). Већи проценат камфора и 1,8-синеола је највероватније разлог боље антимикробне активности уља тестираног у овом истраживању. Ови терпеноиди су познати по свом

антимикробном потенцијалу (Sharifi-Rad et al., 2015). Монотерпени делују на липиде у плазма мембрани микроорганизама, доводећи до промене пропустљивости мембране и цурења интрацелуларног материјала (Radulović et al., 2013). Овај ефекат може бити парцијалан, али дозвољава продор компоненти из спољашње средине и интеракцију са циљаним местима унутар ћелије.

Етарска уља ртањског чаја тестирана у раду Mihajilov-Krstev и сарадника (2014) и Nikolić и сарадника (2014) нису показала активност на изолате *P. aeruginosa*. Исти резултати добијени су и у истраживањима Skočibušić и Bezić (2004) на сој *P. aeruginosa* (ATCC 27853) и Bezić и сарадника (2005) на клиничке изолате, а у којима је испитивано уље садржало 45,7% карвакрола и 12,6% *p*-цимена. Разлог показане резистенције тестираних сојева у овим истраживањима је највероватније примена ниских концентрација уља (10 и 20 $\mu\text{l/ml}$) с обзиром да је уље садржало компоненте које поседују антимикробну активност. Етарско уље ртањског чаја које је садржало карвакрол (35,7%); *p*-цимен (32,3%); γ -терпинен (10,5%) као доминантне компоненте такође није показало активност на сој *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Aćimović, et al., 2022). Уље ртањског чаја које је као доминантне компоненте садржало 53,35% карвакрола, 13,54% γ -терпинена и 13,03% *p*-цимена, испољило је активност при концентрацији од 1,56 mg/ml на сој *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Miladi et al., 2013). У још једном истраживању где су тестирана два етарска уља ртањског чаја различита по хемијском саставу (доминантне компоненте гераниол (22,3%), терпинен-4-ол (10,3%) и карвакрол (10,6%)) и други узорак (31,7% тимол и 23,3% карвакрол) показана је антимикробна активност уља на сој *P. aeruginosa* ATCC 9027 при концентрацији од 3 mg/ml (Ćavar et al., 2008). Mascelli и сарадници (2020) су добили МИК вредности од 3,12 mg/ml (уља добијена у лабораторији) и 1,56 mg/ml (комерцијално уље) при деловању на изолате *P. aeruginosa*. Комерцијално уље садржало је 43,9% карвакрола, 15,3% *p*-цимена и 4,5% γ -терпинена у односу на уља добијена у лабораторији која су садржала нижи проценат карвакрола (29%, 28,7% и 23,9%) и *p*-цимена (10,3%, 9,4% и 12,3%), али већи проценат γ -терпинена (12,3%, 14,7% и 15%). Боља активност комерцијалног уља указује на чињеницу да су већи проценат карвакрола и *p*-цимена одговорни за већи антимикробни потенцијал. Ђорђевић и сарадници (2021) су показали да су етарска уља ртањског чаја добијена различитим методама екстракције имала различити хемијски састав и самим тим остварила различиту антимикробну активност на сој *P. aeruginosa* ATCC 27853. Етарско уље ЕО1 добијено из свежег биљног материјала методом изолације без растварача садржало је висок садржај *p*-цимена, лимонена, *cis*-сабинен хидрата и

гермакрен D и показало најнижу антимикуробну активност са МИК концентрацијом од 15,52 mg/ml. Етарско уље ЕО2 добијено методом екстракције микроталасном пећницом из сувог биљног материјала садржало је карвакрол, тимол и линалол као доминантне компоненте и показало значајно бољу антимикуробну активност у односу на ЕО1 (ЕО2 МИК 2,91 mg/ml). Етарско уље добијено из сувог материјала методом хидродестилације (ЕО3) садржало је знатно већи проценат карвакрола и тимола у односу на ЕО2 и показало је исту антимикуробну активност са МИК од 2,91 mg/ml.

Етарско уље испитано у овом истраживању добијено је методом хидродестилације из сувог биљног материјала и као главне компоненте садржи карвакрол (24,3%), тимол (15,5%) и *p*-цимен (12,2%), а у већим количинама заступљени су и алкохоли *O*-метил карвакрол (8,2%) и борнеол (6%). У поређењу са резултатима наведених истраживања, резултати добијени у овом раду показују да је тестирано уље ртањског чаја испољило снажнији антибактеријски ефекат (најнижа МИК вредност од 0,63 mg/ml), а у прилог боље активности овде тестираног уља иде и чињеница да је испитано на клиничке изолате *P. aeruginosa* од којих је већина показала резистенцију на више од два антибиотика. Оваква антимикуробна активност овде тестираног уља је највероватније последица специфичног састава и комбинације антимикуробних компоненти карвакрола, тимола и *p*-цимена у високим концентрацијама у односу на литературне податке (Skočibušić & Bezić, 2004; Bezić et al., 2005; Ćavar et al., 2008; Miladi et al., 2013; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Nikolić et al., 2014; Maccelli et al., 2020; Đorđević et al., 2021; Aćimović et al., 2022).

Антибактеријска активност етарског уља ртањског чаја приписује се доминантним компонентама тимолу и карвакролу чији је антимикуробни ефекат на ћелије *P. aeruginosa* познат (Soumya et al., 2011; Althunibat et al., 2016), а њихово циљно место деловања је ћелијска мембрана (Langeveld et al., 2014). Осим тога, компоненте са фенолном структуром делују и на липополисахаридни слој изазивајући дезинтеграцију спољашње мембране Грам негативних бактерија (Kalemba & Kunicka, 2003; Nazzaro et al., 2013). Антибактеријска активност карвакрола базирана је на оштећењу бактеријске мембране реметећи градијент протона и синтезу АТФ-а, што даље ремети остале енергетски зависне ћелијске процесе, попут синтезе ензима и токсина (Magi et al., 2015). Тимол је структурни аналог карвакролу и разликују се по положају хидроксилне групе на фенолном прстену. Тимол такође доводи до структурних и функционалних оштећења ћелијске мембране. Деловањем на мембрану повећава њену пермеабилност, што доводи до ослобађања јона K^+ и молекула АТФ-а из ћелије, а реагује и са мембранским

протеинима (Nazzaro et al., 2013). Са друге стране, показано је да *p*-цимен у синергистичкој интеракцији са карвакролом, својом активношћу обезбеђује његов улазак у бактеријску ћелију (Kon & Rai, 2012).

На основу наведеног, можемо закључити да антимикуробни потенцијал етарског уља не зависи само од хемијског састава већ и од процената концентрација активних компоненти, што је потврђено и у истраживању Kundaković и сарадника (2014). Они су испитали антимикуробну активност етарског уља ртањског чаја са два различита локалитета на сој *P. aeruginosa*. Етарско уље пореклом са планине Галичица показало је већу антимикуробну активност, у односу уље пореклом са планине Кораб. Аутори су навели да је снажнија активност етарског уља са Галичице резултат веће концентрације тимола и карвакрола. Са друге стране, хемијски састав етарског уља ртањског чаја не зависи само од локалитета, већ на састав уља утичу и надморска висина, као и фаза онтогенезе у којој се биљка налази. Mihajilov-Krstev и сарадници (2014) су доказали да са порастом надморске висине, опада концентрација фенолних компонената уља, тимола и карвакрола. У истраживању Skočibušić и Bezić (2004) утврђено је да је проценат карвакрола (52,4%) и γ -терпинена (5,8%) највећи у узорцима уља добијених сакупљањем биљке у фази пре цветања а затим опадају у узорцима уља добијених током фазе цветања и након цветања (карвакрол (26,2%, 16,1%), γ -терпинен (4,9%, 0%)). Са друге стране, проценат *p*-цимена расте у узорцима уља добијених у фази цветања (15,2%) и након цветања биљке (25,6%), у односу на узорке добијене пре цветања биљке (3,8%). Гераниол (10,2%) се јављао само у узорку уља добијеног од биљака у фази цветања.

5.6. Ефекат етарских уља на раст изолата *P. aeruginosa*

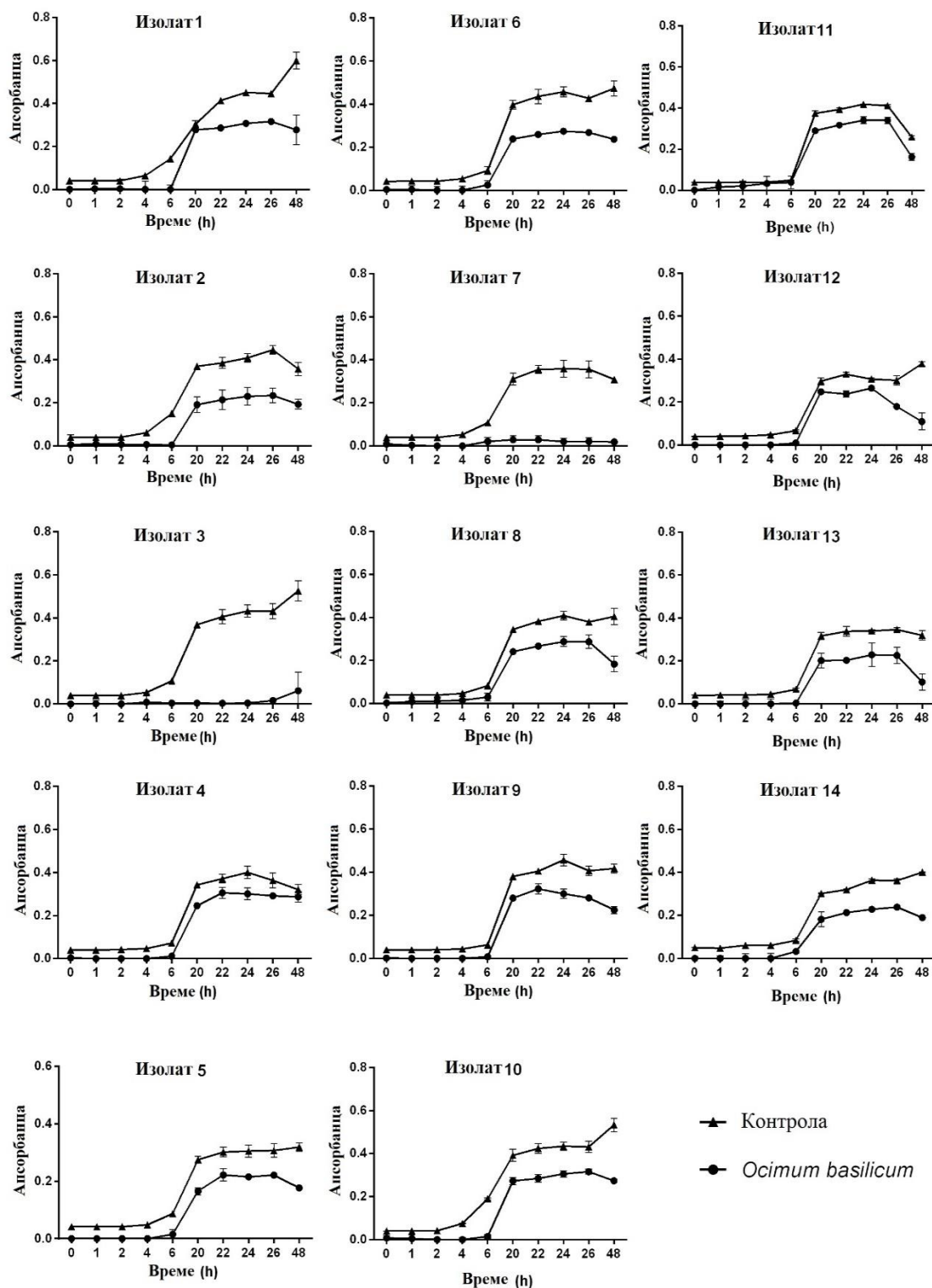
Након испитане антимикуробне активности етарских уља, праћен је њихов ефекат на раст ћелија подвргнутих МИК концентрацијама током култивационог периода од 48 h и резултати су приказани као криве раста. Инхибиција бактеријског раста уочена је током првих 21 h третмана, након чега је детектован благи опоравак код појединих изолата, али су уља значајно смањила бројност популација у поређењу са нетретираном контролом (Слика 5, 6 и 7).

Након периода култивације од 48 h, уље босиљка је показало инхибицију раста у распону од 10,5-94% (Слика 5). Највећа активност постигнута је на изолат 7, где је после 48 h забележено смањење раста од 93,95%. Са друге стране, изолат 4 је показао нешто већу резистенцију у односу на остале изолате где је измерена инхибиција раста од само 10,5%.

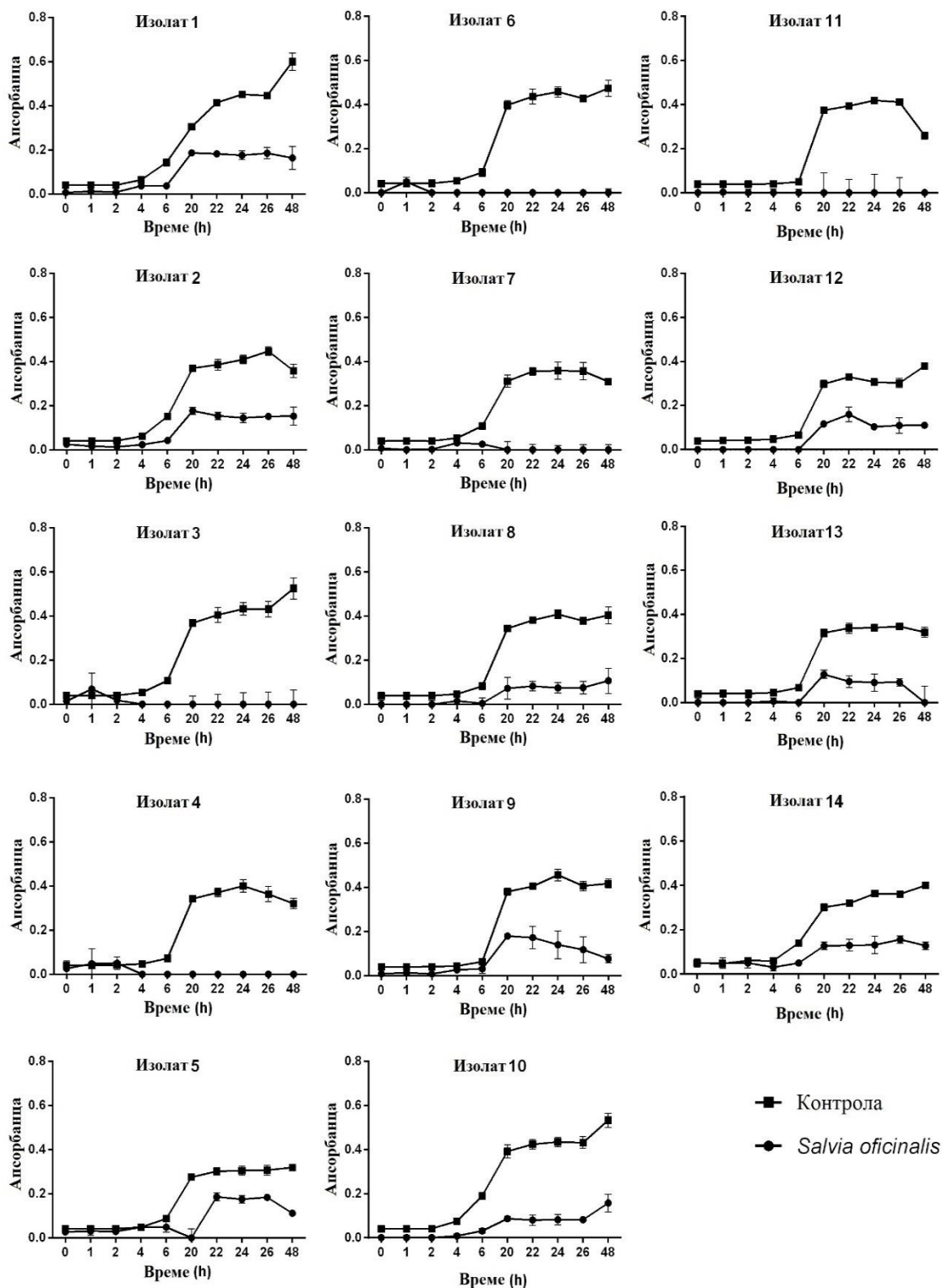
У случају примене уља жалфије примећена је већа инхибиција, која се кретала у опсегу од 48,5 до 100% (Слика 6). Етарско уље жалфије испољило је најснажнији ефекат на раст изолата 3, 4, 6, 7, 11 и 13, где је измерена редукција раста од 100%. Уље је ефикасно спречило поновни раст ових изолата и минимална инхибиторна концентрација показала се и минималном бактерицидном (најнижа концентрација агенса која убија ћелије).

Смањење раста у случају примене уља ртањског чаја кретало се у распону од 31-100%, а резултати су приказани на Слици 7. Најслабији ефекат етарског уља уочен је у случају изолата 6, где је измерена редукција раста била 31%. Највећа активност уља постигнута је у случају изолата 8 и 12, где је дошло до потпуне инхибиције раста (100%) (минимална инхибиторна концентрација била је уједно и минимална бактерицидна концентрација (МБК)). Карактеристично за ова два изолата (8 и 12) је да су показала резистенцију на антибиотик ципрофлоксацин. При деловању на изолате 1, 3, 7, 9, 13 и 14 уље је редуковало раст од 82%, 73%, 88%, 88%, 69% и 92%. Нешто слабији ефекат забележен је случају изолата 2 (54%), 4 (64%), 5 (52%), 10 (46%) и 11 (52%).

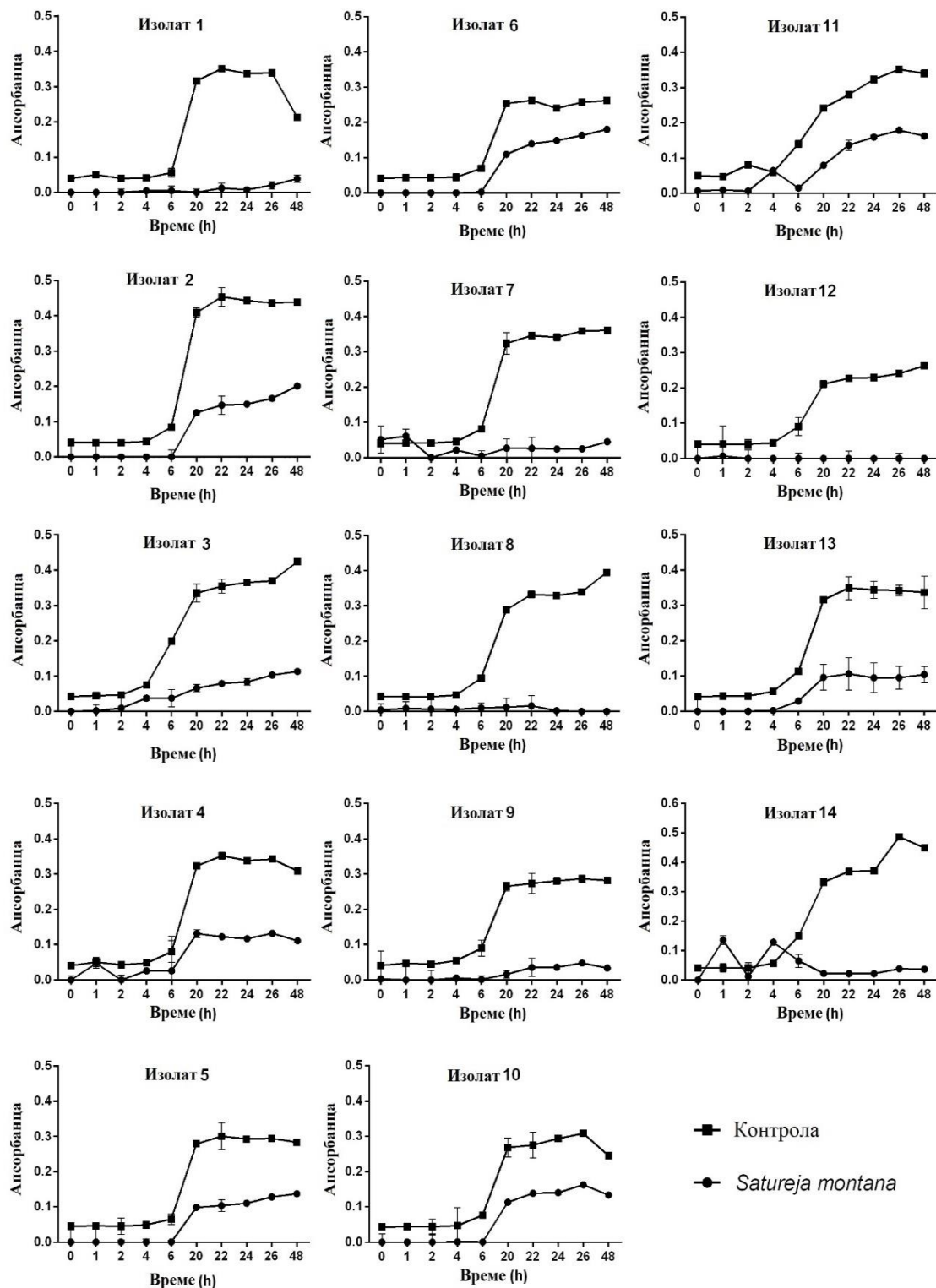
Након укупног периода инкубације, LD₅₀ (редукција преко 50% укупне величине популације) постигнута је код 93% тестираних изолата након третмана уљем жалфије, 57% након апликације уља босиљка и код 86% изолата након третирања уљем ртањског чаја, што је показало највећу ефикасност уља жалфије током дужег временског интервала. Уље жалфије показало је бактерицидни ефекат и код највећег броја тестираних изолата.



Слика 5. Графички приказ криви раста изолата *P. aeruginosa* након третмана уљем *Ocimum basilicum* у МИК концентрацијама. Резултати су приказане као средње вредности \pm SD и анализирани су Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey post-hoc тестом.



Слика 6. Графички приказ кривих раста изолата *P. aeruginosa* након третмана уљем *Salvia officinalis* у МИК концентрацијама. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey post-hoc тестом.



Слика 7. Графички приказ кривих раста изолата *P. aeruginosa* након третмана уљем *Satureja montana* у МИК концентрацијама. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey post-hoc тестом.

Истраживања су показала да је антимикуробна активност етарских уља последица присуства неких доминантних али и мање заступљених компоненти, као и типа интеракција међу њима (Mitic-Culafić et al., 2005; Van Vuuren et al., 2009; Bassolé et al., 2010). Претходна истраживања која су испитивала ефикасност етарског уља босиљка на *P. aeruginosa* показала су кретање минималних инхибиторних концентрација у опсегу од 1,024 до 40 mg/ml (Hammer et al., 1999; Niculae et al., 2009; Silva et al., 2016; Đorđević et al., 2022). Ова истраживања нису испитивала утицај уља на кинетику раста *P. aeruginosa* током дужег временског интервала, што нам онемогућава да поредимо активност са овде тестираним уљем босиљка. Међутим, резултати испитиване кинетике раста *S. aureus* MRSA (метицилин-резистентни *Staphylococcus aureus*) клиничких изолата у присуству уља босиљка богатог линалолом показују смањење броја ћелија у првих 30 минута примене уља и наставак овог тренда до краја инкубационог периода од 24 h (Oralchenova & Obreshkova, 2003). Слични резултати добијени су и за испитиване МИК концентрације уља босиљка на сој *Candida albicans* АТТС 10023, где је након 2 h уље значајно редуковало број живих ћелија (Gucwa et al., 2018). Такође је показано је да линалол (доминанта компонента овде испитаног етарског уља босиљка) при МИК концентрацији инхибира раст ћелија *P. aeruginosa* у првих 22 h, након чега је уочен слабији опоравак ћелија, док при МБК концентрацији потпуно инхибира раст ћелија током 36 h инкубације (Liu et al., 2020).

Етарска уља *Salvia officinalis* која садрже α -тујон, камфор и 1,8-синеол као главне компоненте нису показала активност на изолате *P. aeruginosa* (Delamare et al., 2007; Damjanović-Vratnica et al., 2008; El-Hosseiny et al., 2014; Аџимовић et al., 2022). Друга истраживања (Niculae et al., 2009; Adrar et al., 2016) су показала ефикасност овог уља на сојеве *P. aeruginosa*, али нису испитивала његову активност на њихову кинетику раста. Једино истраживање у овом смислу урадили су Khalil & Li (2011) који су утврдили веома ниску активност на раст соја *Pseudomonas aeruginosa* (АТСС 27853) током периода инкубације од 24 h. Свака тестирана концентрација (5, 10 и 20 μ l/ml) утицала је на мали број ћелија након 10 минута и 1 h, што није довело до промене бројности популације након укупног периода инкубације (Khalil & Li, 2011). Поменуто уље садржало је као доминантну компоненту 1,8-синеол (62%) (Khalil & Li, 2011), док се уље жалфије тестирано у овом истраживању разликује у хемијском саставу и садржи као главне компоненте α -тујон (29,7%), камфор (16,6%) и 1,8-синеол (9,2%). Овакав хемијски састав је највероватније разлог боље активности овде тестираног уља. Са друге стране, етарско уље *Salvia officinalis* које је по хемијском саставу (α -тујон 37%, камфор 14% и

1,8-синеол 14%) слично овде тестираном уљу, показало је обећавајуће резултате на кинетику раста *S. aureus* и *B. subtilis*. Етарско уље жалфије и фракције са високим садржајем α -тујона су испољиле бактерицидни ефекат на *S. aureus*, а у интервалу од 4 h популација је потпуно редукована. Са друге стране, фракције које су садржале камфор и 1,8-синеол као главне компоненте испољиле су слабији ефекат, показујући да је α -тујон одговоран за антимикуробну активност (Mitić-Culafić et al., 2005).

Истраживања које су испитивале антимикуробну активност етарског уља ртањског чаја на сојеве *P. aeruginosa* утврдиле су МИК концентрације у опсегу од 1,56 до 15,52 mg/ml (Ćavar et al., 2008; Miladi et al., 2013; Maccelli et al., 2020; Ђорђевић et al., 2021), што је слично резултатима добијеним у овом истраживању (МИК 0,63-10 mg/ml). Међутим, ова истраживања нису испитивале утицај уља на кинетику раста сојева *P. aeruginosa* током дужег временског интервала, што нам не даје могућност да њихове резултате поредимо са резултатима овде тестираног уља ртањског чаја. На основу претраге литературних података, закључено је да није испитиван утицај етарског уља *Satureja montana* на кинетику раста микроорганизама и није тестиран његов ефекат током дужег временског интервала. Са друге стране, показано је да доминантна компонента овде тестираног уља ртањског чаја, карвакрол, испољава своју активност и доводи до редукције ћелија *P. aeruginosa* 1 h након третмана када је растворен у етанолу и 2 h након третмана када је растворен у ДМСО (Hasanvand et al., 2021). Резултати добијени у овом истраживању показују да уље ртањског чаја делује у самом старту третмана и задржава редукујући ефекат до 21 h након примене, док је након тога уочен благи опоравак ћелија код појединих изолата, међутим тај број ћелија је много мањи у односу на контролне узорке. Овакав ефекат уља може се преписати доминантној компоненти карвакролу.

Када упоредимо са литературним подацима, етарска уља тестирана у овом истраживању показала су већу активност током дужег временске примене. Као посебан значај у смислу њихове ефикасности треба нагласити да су ова уља испољила добар инхибиторни ефекат у односу на сојеве који су изолати и који се генерално одликују већом резистенцијом на антибиотике.

4.7. Карактеризација фактора вируленције клиничких изолатата *P. aeruginosa*

Порекло и фенотипске карактеристике у смислу фактора вируленције типичних за врсту *P. aeruginosa* (осетљивост изолатата на спектар антибиотика, интензитет продукције биофилма у различитим фазама (три фазе формирања: пре адхезије, након адхезије и зрео биофилм), тип и интензитет покрета (swimming-пливање, swarming-ројење и twitching-трзање) и интензитет продукције пиоцијанина) приказане су у Табели 13. Сојеви су класификовани као јаки, средњи, слаби или не продуценти биофилма (Stipanović et al., 2007). Сви тестирани изолати су окарактерисани као јаки продуценти биофилма, није било разлике повезане са временом и начином култивације, осим чињенице да бактерије продукују мање биофилма када се бујон замени свежим након фазе адхезије (када се уклоне планктонске ћелије). Бактерије су култивисане на овај начин како би се испитао утицај планктонских ћелија у продукцији биофилма након периода адхезије и резултати указују на важност овог корака у продукцији биофилма.

На основу резултата добијених за покретљивост, може се закључити да постоји негативна корелација између покрета пливања и трзања.

Када узмемо у обзир продукцију пиоцијанина, може се рећи да постоји позитивна корелација између продукције овог пигмента и покрета ројења и трзања, као и негативна корелација између продукције пиоцијанина и покрета пливања.

Lima и сарадници (2018) су у свом истраживању показали да 77,5% (31/40) тестираних клиничких изолатата *P. aeruginosa* има способност продукције биофилма, од којих је 42,5% (17/40) изолатата класификовано као слаби, 27,5% (11/40) као умерени и 7,5% (3/40) као јаки продуценти. Клинички изолати тестирани у овом истраживању показали су знатно већи потенцијал за формирање биофилма у односу на резултате других истраживања.

Табела 13. Порекло и карактеристике вируленције изолата *P. aeruginosa*.

Изолати	Порекло узорка	Продукција биофилма пре адхезије*	Продукција биофилма након адхезије**	Зрео биофилм***	Резистенција	Swimming	Swarming	Twitching	Продукција пиоцијанина
Бр. 1	Брис грла	Јак продуцент	Јак	Јак	С	+++	+	+	Слаб
Бр. 2	Брис грла	Јак продуцент	Јак	Јак	С	++	++	++	Јак
Бр. 3	Узорак урина	Јак продуцент	Јак	Јак	Р	++++	+	+	Слаб
Бр. 4	Узорак урина	Јак продуцент	Јак	Јак	Р	+++	++	+++	Јак
Бр. 5	Узорак урина	Јак продуцент	Јак	Јак	С	++	+++	+++	Умерен
Бр. 6	Узорак урина	Јак продуцент	Јак	Јак	С	+	+++	++	Јак
Бр. 7	Брис коже	Јак продуцент	Јак	Јак	С	+++	++	+	Слаб
Бр. 8	Брис ока	Јак продуцент	Јак	Јак	Р	+++	+++	+	Умерен
Бр. 9	Брис ока	Јак продуцент	Јак	Јак	Р	+++	++	+	Јак
Бр. 10	Брис ране	Јак продуцент	Јак	Јак	Р	++++	+++	+	Умерен
Бр. 11	Брис ране	Јак продуцент	Јак	Јак	С	++	+	+	Слаб
Бр. 12	Брис ране	Јак продуцент	Јак	Јак	Р	+++	+	+	Слаб
Бр. 13	Брис уха	Јак продуцент	Јак	Јак	Р	+++	++	+	Слаб
Бр. 14	Брис коже	Јак продуцент	Јак	Јак	С	+++	+++	+	Умерен

С- изолат осетљив на све тестиране антибиотике; Р- резистентан на више од једног тестираног антибиотика.

+ Зона покретљивости (mm) < 15 mm; ++ Зона покретљивости (mm) < 30 mm; +++ Зона покретљивости (mm) > 30 mm.

Продукција пиоцијанина приказана као слаб продуцент $A_u \leq 3A_k$; умерен продуцент када је апсорбанца узорка била $3A_k < A_u \leq 5A_k$; и јак када је $A_u > 5A_k$.

* Продукција биофилма током 24 h инкубационог периода без замене медијума.

** Продукција биофилма када се уклоне планктонске ћелије након 2 h иницијалног периода адхезије и након додавања свежег медијума.

*** Продукција биофилма када се ћелије инкубирају 24 h након чега се медијум замени свежим и инкубирају још додатних 24 h

4.8. Утицај етарских уља на продукцију биофилма *P. aeruginosa*

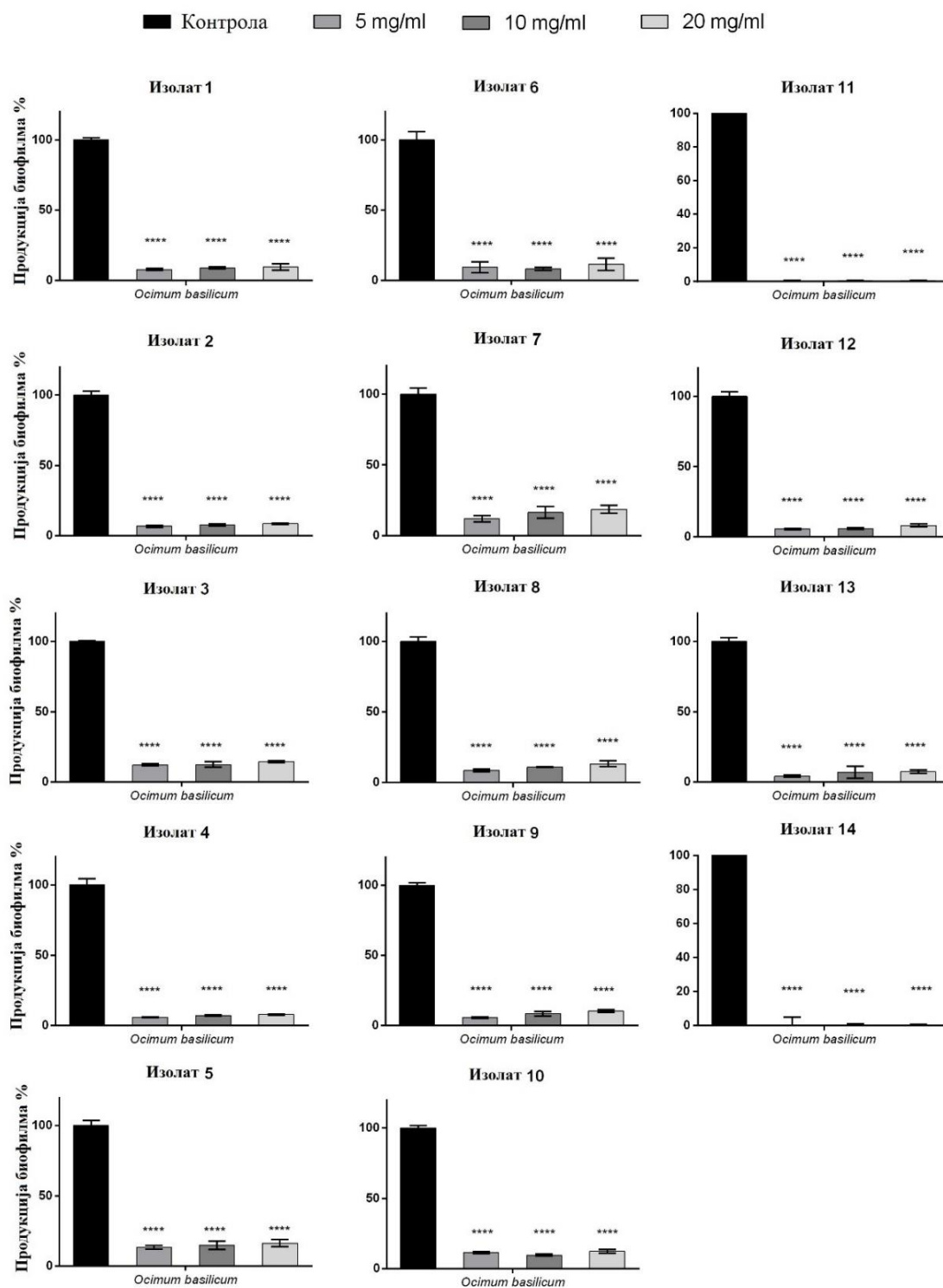
4.8.1. Формирање биофилма у фази пре адхезије (Pre-adhesion biofilm formation)

Резултати утицаја уља босиљка, жалфије и ртањског чаја на продукцију биофилма примењених у самом старту култивационог периода (0 h) приказани су на Сликама 8, 9 и 10. Овај ефекат уља испитиван је у концентрацијама од 5, 10 и 20 mg/ml за уља босиљка и жалфије, док је у случају етарског уља ртањског чаја због знатно боље активности и ширег спектра инхибиторних концентрација, концентрација прилагођавана соју (МИК/2, МИК и 2xМИК).

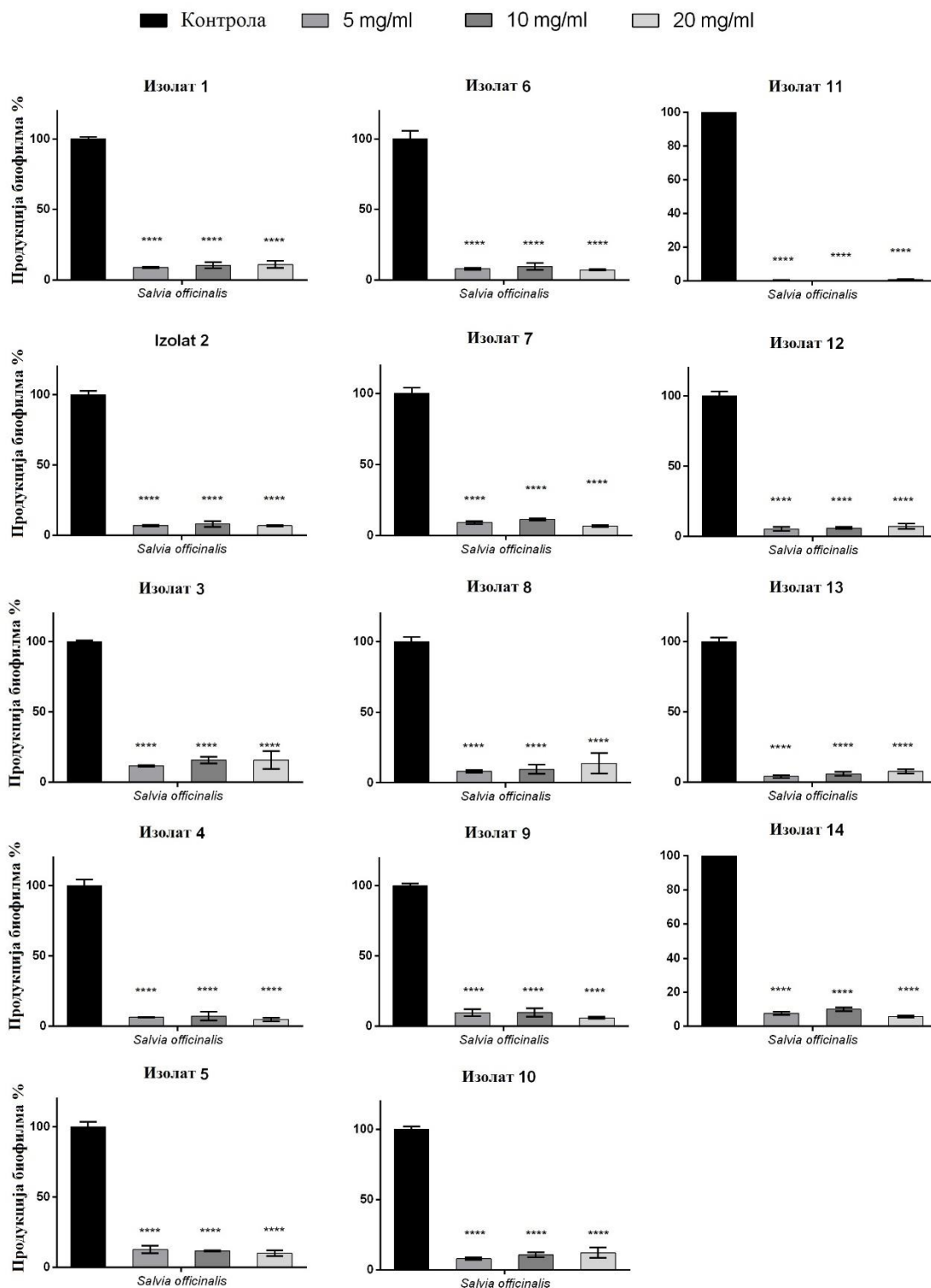
Када је уље босиљка примењено у фази пре адхезије ћелија, показало је инхибицију продукције биофилма у распону од 86,7-99,9% (5 mg/ml), 83,6-99,7% (10 mg/ml), док је концентрација од 20 mg/ml инхибирала продукцију биофилма у опсегу 81,4-99,9% (Слика 8). Највећа инхибиција при свим тестираним концентрацијама постигнута је на изолате 14 (99,7-99,9%) и 11 (99,4-99,5%), док су изолати 3 (инхибиција у распону 85,5-87,8), 5 (83,6-86,7%) и 7 (81,4-87,9%) показали нешто већу резистенцију у односу на остале.

У случају примене уља жалфије добијени су слични резултати (Слика 9), где је инхибиција продукције биофилма била у распону од 87,4-99,6% при концентрацији од 5 mg/ml, 84,1-99,6% (10 mg/ml) и 86,1-99,2% (20 mg/ml). Највећа активност уља уочена је код изолата 11 где је инхибиција била у распону од 99,2-99,6% за све тестиране концентрације. Најнижа активност уочена је код изолата 3 и 5 (смањење продукције биофилма у распону од 84,1-88,3% и 87,4-90,0%).

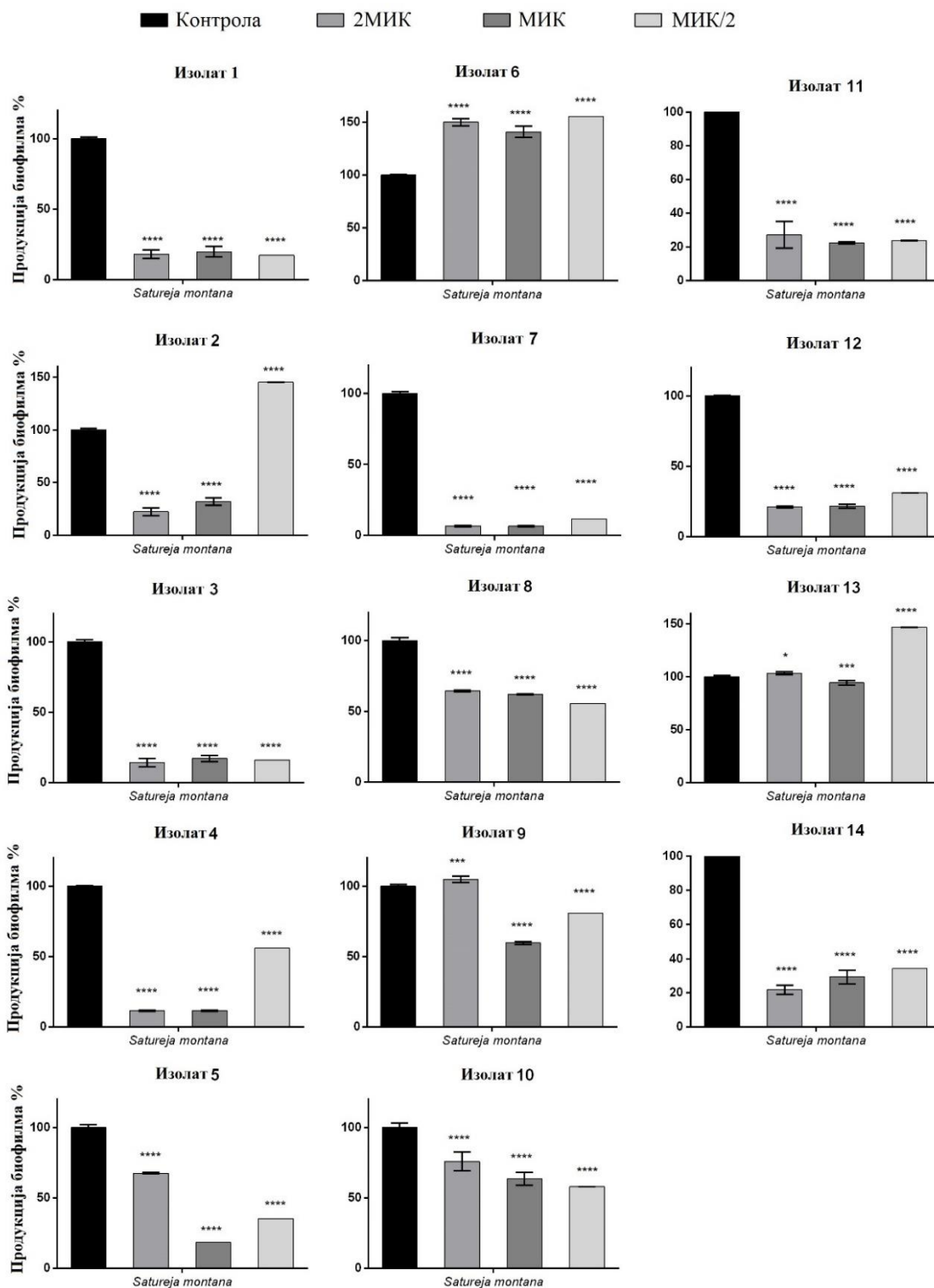
Етарско уље ртањског чаја инхибирало је продукцију биофилма до 93,6% и резултати су приказани на Слици 10. Опсег инхибиције биофилма под утицајем уља износио је 19,1-88,5% при МИК/2, при деловању МИК 5,6-93,6%, док је забележен опсег 24,2-93,5% при 2xМИК концентрацији. Највећи ефекат забележен је у односу на изолате 1, 3, 7 и 12. Најнижи ефекат уље је остварило на изолат бр. 10 где је редукција створеног биофилма била у распону 24,2-41,9%.



Слика 8. Редукција биофилма изолата *P. aeruginosa* након третмана уљем *Ocimum basilicum* на почетку инкубационог периода- фаза пре адхезије ћелија. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.



Слика 9. Редукција биофилма изолата *P. aeruginosa* након третмана уљем *Salvia officinalis* на почетку инкубационог периода- фаза пре адхезије ћелија. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу



Слика 10. Редукција биофилма изолатаа *P. aeruginosa* након третмана уљем *Satureja montana* на почетку инкубационог периода- фаза пре адхезије ћелија. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Уље ртањског чаја је показало промотивни ефекат на продукцију биофилма и то при концентрацији МИК/2 у случају изолата 2, у случају изолата 6 при свим тестираним концентрацијама, као и код изолата 9 и 13 при деловању 2xМИК и МИК концентрација.

Код примене уља није уочена концентрациона зависност и статистичке анализе нису показале значајне разлике у инхибицији биофилма у зависности од примене различитих концентрација ових уља. Код већине изолата, најнижа тестирана концентрација уља примењена у раној фази (пре адхезије) формирања биофилма довела је до веће инхибиције у формирању биофилма у поређењу са другим тестираним концентрацијама. Ова појава је такође примењена у многим случајевима где је показано да веће концентрације доводе до мање редукције биофилма. Исто је примењено и у истраживању Artini и сарадника (2018), где је показано да етарска уља немају увек концентрационо зависни ефекат на смањење биофилма *P. aeruginosa*. Овакво понашање је највероватније одговор на стрес изазван високим концентрацијама агенса, што доводи до веће адхеренције ћелија и повећане продукције егзополисахарида (ЕПС) (Niu & Gilbert, 2004). Повећање ЕПС у присуству токсичних супстанци и метала примењено је и код биофилмова *P. aeruginosa*. ЕПС могу формирати заштитну баријеру како би спречили утицаје из спољашње средине, а на тај начин (ометањем дифузије и продора у биофилм) токсичност агенаса је смањена (Fang et al., 2002). Мања бактеријска осетљивост на високе концентрације уља може се објаснити ограничењем изазваним самим високим концентрацијама услед смањене интеракције са ћелијама или активирањем неких од механизма резистенције, попут ефлукс пумпи (Vecerril et al., 2012).

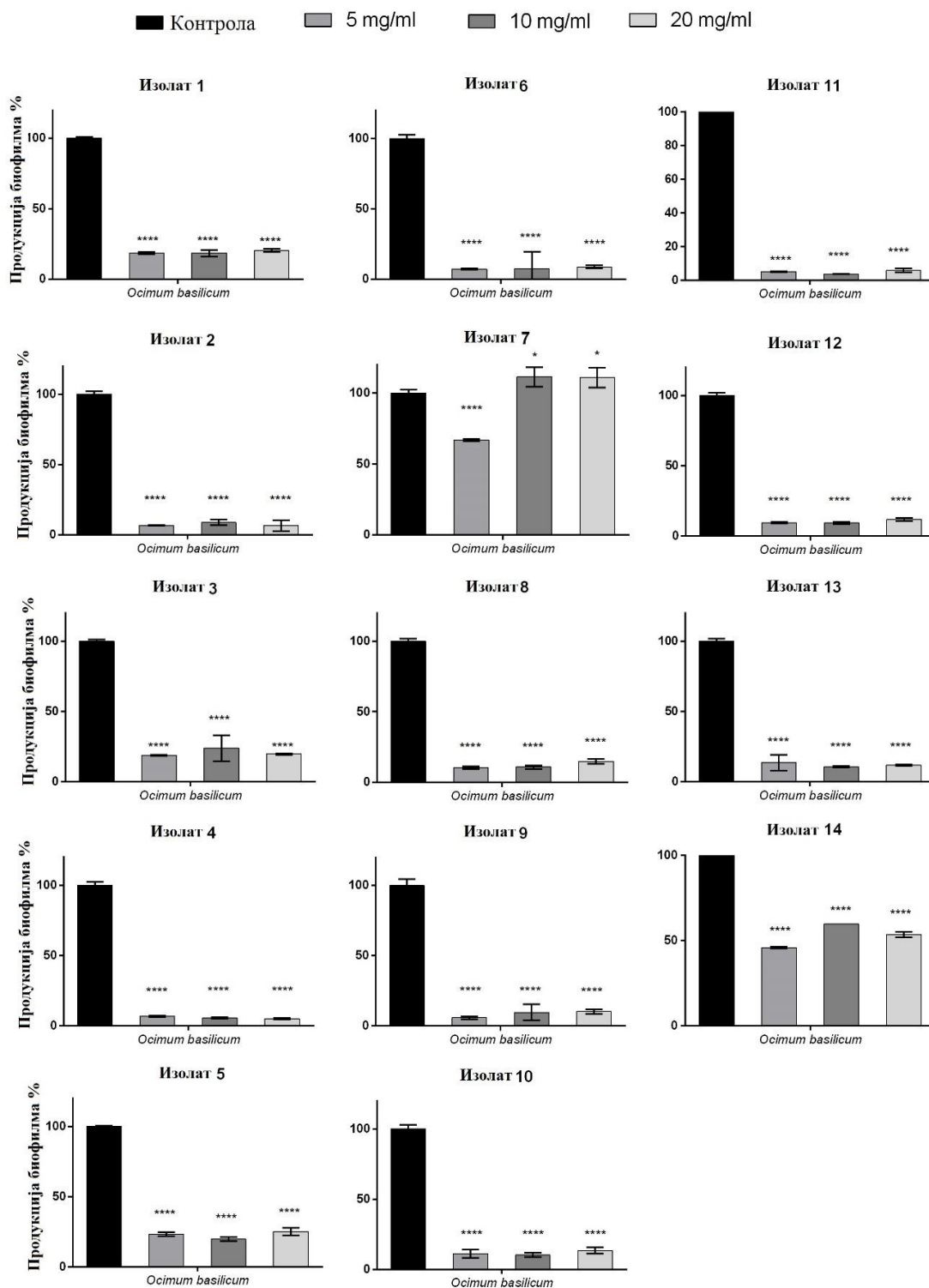
У првом делу експеримента (Слика 4) спроведеном на првих 14 изолата *P. aeruginosa* међу којима је пет изолата било мултирезистентно, уље жалфије показало је нешто већу инхибицију продукције биофилма у односу на уље босиљка. Најрезистентнији изолат, резистентан на све тестиране антибиотике, показао је резистенцију и на оба уља, док је продукција код друга два мултирезистентна изолата (који су показали осетљивост само на један антибиотик) била инхибирана само након примене уља жалфије. У овом делу испитан је утицај већих концентрација уља (10-40 mg/ml), а концентрациона зависност уочена је само код неколико изолата и то само у случају када је примењено уље жалфије. Нижа активност уља добијена у првом делу експеримента (Слика 4) највероватније је последица веће резистенције тестираних изолата на антибиотике, чак иако су тестирани изолати показали нижу способност продукције биофилма, у односу на други сет изолата тестираних у другом делу

експеримента (само два од пет изолата су се показала као јаки продуценти биофилма). Међутим, неки од сојева који су показали високу резистенцију на антибиотике били су осетљивији на оба уља у односу на сојеве који су били осетљиви на антибиотике. Слични резултати добијени су и за други сет изолата, где су сојеви резистентни на више од једног антибиотика показали осетљивост на сва три тестирана уља. Ови резултати показали су да се осетљивост на антибиотике не може увек повезати са осетљивошћу на уља. Разлог томе је највероватније различит механизам активности уља и антибиотика.

4.8.2. Формирање биофилма након фазе адхезије (Post-adhesion biofilm formation)

Бактеријска адхезија има кључну улогу у формирању колонија (Beachey, 1981), а њен успех зависи од односа између површине и ћелија (Freter & Jones, 1983). Код соја *P. aeruginosa* адхезија је кључна у формирању биофилма и повезана је са бактеријском покретљивошћу (Overhage et al., 2008). Овај процес се дешава у првих 30 минута до 4 h инкубације и тада ћелије формирају први слој биофилма (монослој), а након тог периода процес адхезије постаје иреверзибилан (O'Toole & Kolter, 1998). Због тога је у овом истраживању покушано да се одреди у којој фази биофилма тестирано уље постиже највећу ефикасност. Да би се то постигло (односно да би се одредио ефекат тестираних уља на иницијални адхерирани слој ћелија) уља су додата два сата након инкубационог периода и остављена на инкубацију још 22 h, након чега је измерена продукција биофилма. Резултати формирања биофилма након иницијалне адхезије у присуству или без етарских уља приказан је на Сликама 11, 12 и 13. Примена уља након адхезионог периода смањила је продукцију биофилма адхерираних ћелија, али резултати указују на значајно нижу редукцију биофилма у односу на редукцију добијену применом уља пре адхезије ћелија. Као и у претходном експерименту, ни у овој фази формирања биофилма није уочена концентрациона зависност на инхибицију формирања биофилма.

Након апликације уља босиљка у највећој тестираној концентрацији, продукција биофилма инхибирана је у опсегу од 46,4 до 94,9% зависно од изолата. Концентрација од 10 mg/ml истог уља инхибирала је формирање биофилма чак до 96,3%, док је најнижа уочена инхибиција била 40,2%. Сличан ефекат уочен је при концентрацији од 5 mg/ml, где је уље смањило продукцију биофилма за 33,1-94,9% (Слика 11).



Слика 11. Продукција биофилма изолата *P. aeruginosa*, изражена у процентима у присуству уља *Ocimum basilicum* након фазе адхезије ћелија у односу на контролне узорке. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

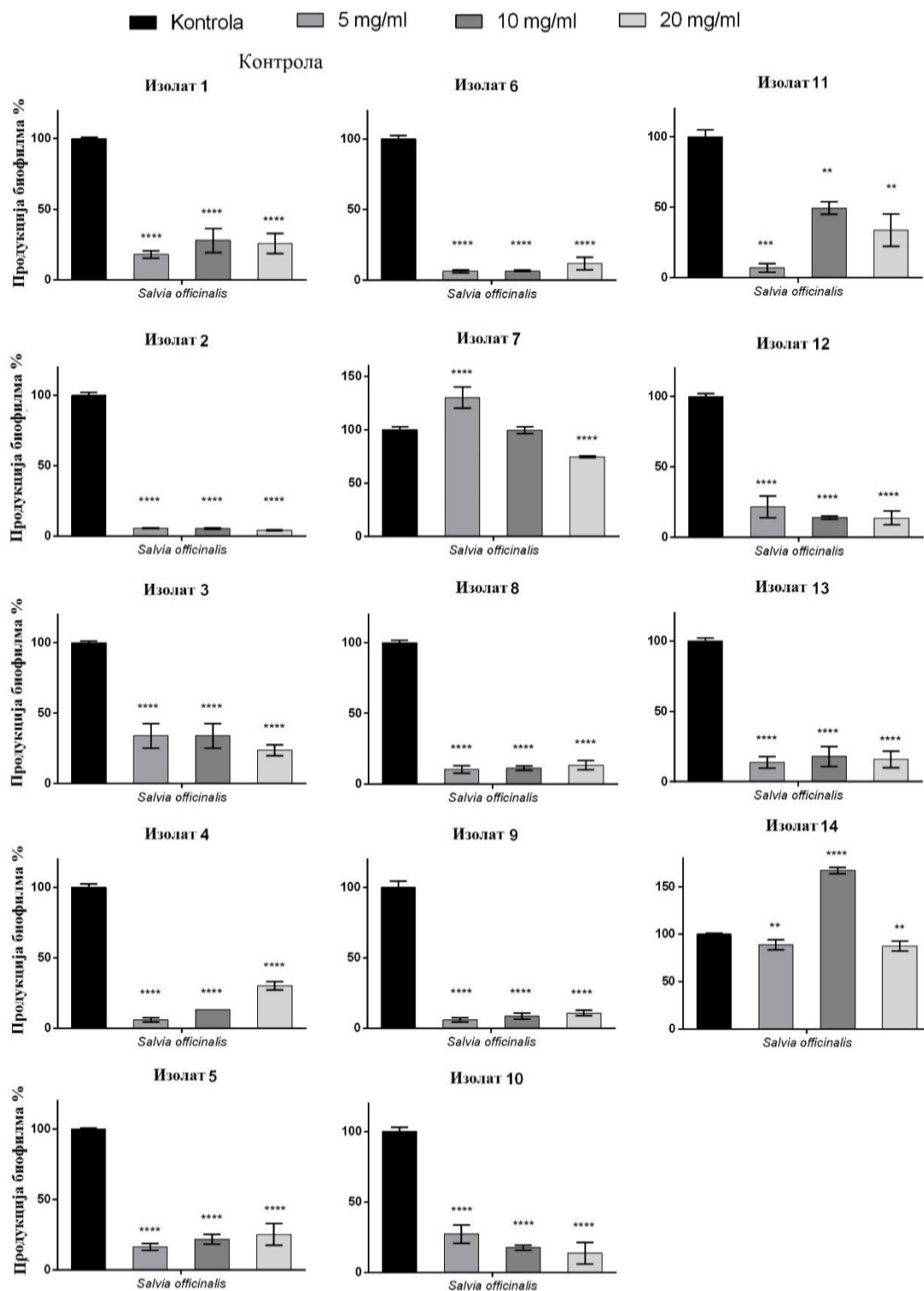
Највећи ефекат на смањење продукције биофилма у присуству уља босиљка уочен је код изолата 11, док је изолат 14 показао најмању осетљивост на уље босиљка.

Највећа концентрација уља жалфије довела је до инхибиције биофилма у распону од 12,4 до 95,7% апсорбанце контролне културе. Концентрација од 10 mg/ml довела је до ниже инхибиције (0,4-94,5%), док је концентрација 5 mg/ml инхибирала продукцију биофилма од 11,3 до 94,2% зависно од изолата (Слика 12).

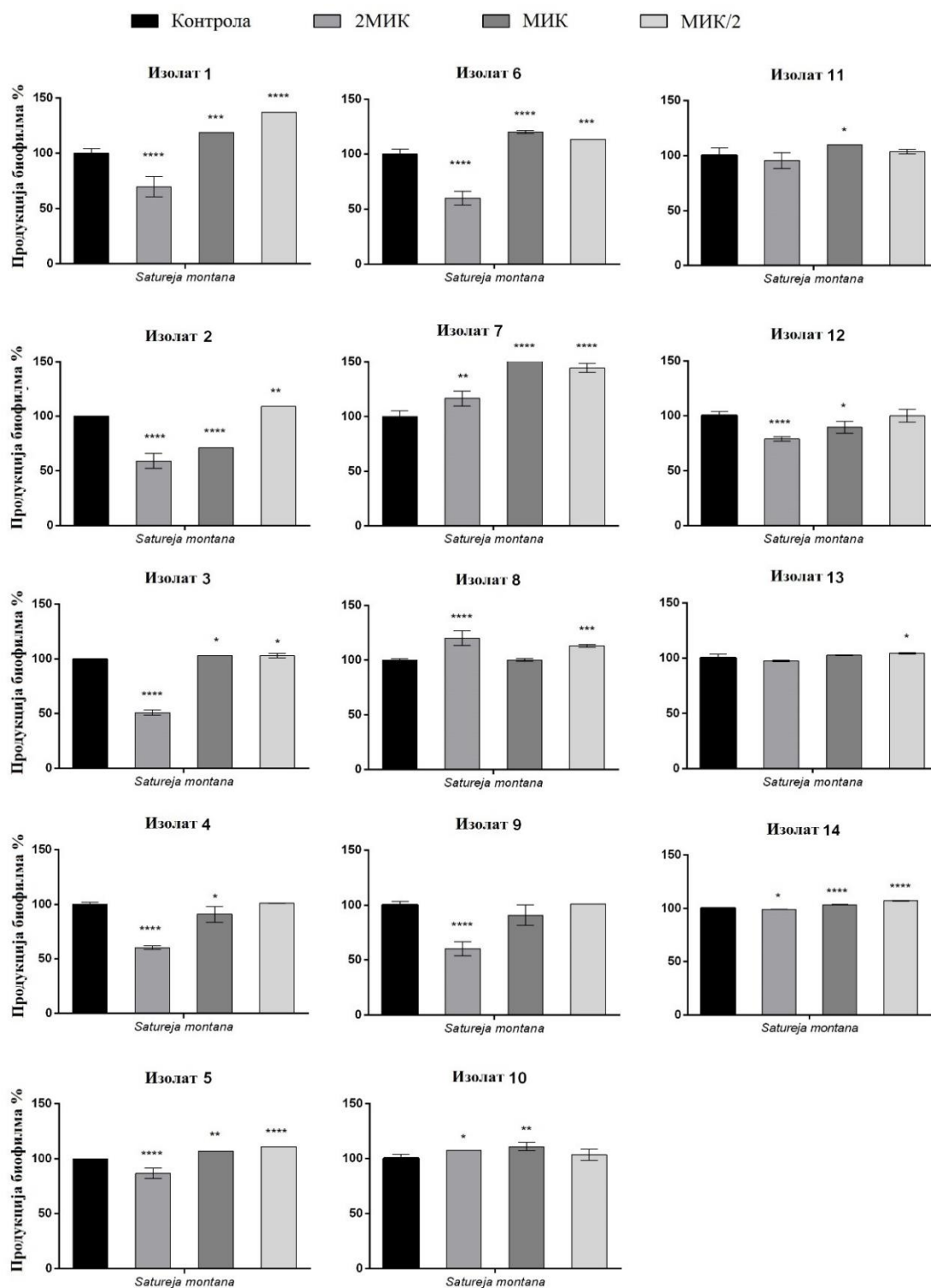
Када погледамо резултате добијене након примене уља ртањског чаја можемо уочити да је ово уље показало најнижу активност на инхибицију биофилма адхерираних ћелија (Слика 13). До нешто значајније инхибиције довела је примена уља у 2xМИК концентрацији, где је највећи проценат редукције биофилма уочен је код изолата 3 и износио је 48,88%. Примена уља у МИК концентрацији довела је до инхибиције биофилма код изолата 2 (28,83%), изолата 4 (9,2%), изолата 9 (9,16%) и изолата 12 (10,33%). За разлику од МИК и 2xМИК, примена уља у МИК/2 концентрацији није довела до редукције биофилма.

Према приказаним резултатима за сва три тестирана уља, укупан ефекат на инхибицију биофилма након фазе адхезије био је највећи у случају примене уља босиљка.

Са друге стране, након примене сва три уља код неких од изолата уочена је промоција продукције биофилма уместо инхибиције. Примена уља босиљка на већ адхерирание ћелије изолата 7 довела је до промоције продукције биофилма, док је након примене уља жалфије промовишући ефекат уочен код изолата 7 и 14. Уље ртањског чаја довело је до промоције биофилма код највећег броја изолата. Промотивни ефекат овог уља уочен је након примене МИК/2 концентрације код свих тестираних изолата, док је МИК концентрација довела до промоције биофилма код 71,43%, а 2xМИК концентрација код 21,43% изолата. Примена уља у свим тестираним концентрацијама довела је до промоције биофилма код изолата 7, 8, и 10.



Слика 12. Продукција биофилма изолата *P. aeruginosa*, изражена у процентима у присуству уља *Salvia officinalis* након фазе адхезије ћелија у односу на контролне узорке. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.



Слика 13. Продукција биофилма изолата *P. aeruginosa*, изражена у процентима у присуству уља *Satureja montana* након фазе адхезије ћелија у односу на контролне узорке. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Промовишући ефекат продукције биофилма изазван различитим биљним метаболитима уочен је и у ранијим истраживањима. Резултати добијени у овом истраживању у сагласности су са истраживањем које су спровели Sandasi и сарадници (2011), где је наведено да третман биљним екстрактима *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Echinacea angustifolia*, *Camellia sinensis* и *Hypericum perforatum* побољшава везивање ћелија и развој биофилма код АТСС сојева али и клиничких изолата *P. aeruginosa*. Бактеријске ћелије инкубиране су 4 h, након тога додати су екстракти и плоче су остављене на инкубацију још 24 h. Резултати су показали повећање продукције биофилма и до 100%. Повећање продукције биофилма уочено је и у истраживању Zodrow и сарадника (2012), након третмана ћелија *P. aeruginosa* нижим концентрацијама (из опсега који је тестиран) цинамалдехида. Leonard и сарадници (2010) су такође показали повећање биофилмова *Listeria monocytogenes* након третмана етарским уљима и чистим компонентама R(-)-карвоном и еугенолом. Ћелије су инкубиране 6 h да би се омогућило формирање биофилма, након чега су примењена етарска уља (*Cymbopogon citratus*, *Lippia rehmannii*, *Mentha spicata* и *Syzygium aromaticum*) и чисте компоненте (R(-)-карвон, еугенол, цитрал и нерол) и ћелије инкубиране још 18 h. Етарска уља *M. spicata* и *S. aromaticum* показују антибиофилм ефекат док њихове чисте компоненте R(-)-карвон и еугенол повећавају продукцију биофилма са 0,10 на 0,63 (карвон) и 0,36 (еугенол). Још једно истраживање са чистим монотерпенима (α -пинен, 1,8-синеол, лимонен, линалол и геранил ацетат) примењеним у концентрацијама од 1 mg/ml показала је да ове компоненте доводе до веће продукције биофилма код соја *L. monocytogenes* (Sandasi et al., 2008). На основу модела машинског учења показано је да 1,8-синеол има промотивни ефекат на продукцију биофилма соја *S. aureus* 6538P (Papa et al., 2020).

До сада, у литератури није дато објашњење којим се наводи конкретан механизам промотивног ефекта ових једињења на продукцију биофилма, али се зна да је уклањање подлоге и планктонских ћелија након два сата довела до редукције концентрације сигналних молекула (QS молекула). Наведене чињенице у комбинацији са стресним условима (додавање етарског уља) су вероватно покренули експресију гена кључних за повећање резистенције, у које спада и повећана продукција биофилма.

4.8.3. Зрео биофилм

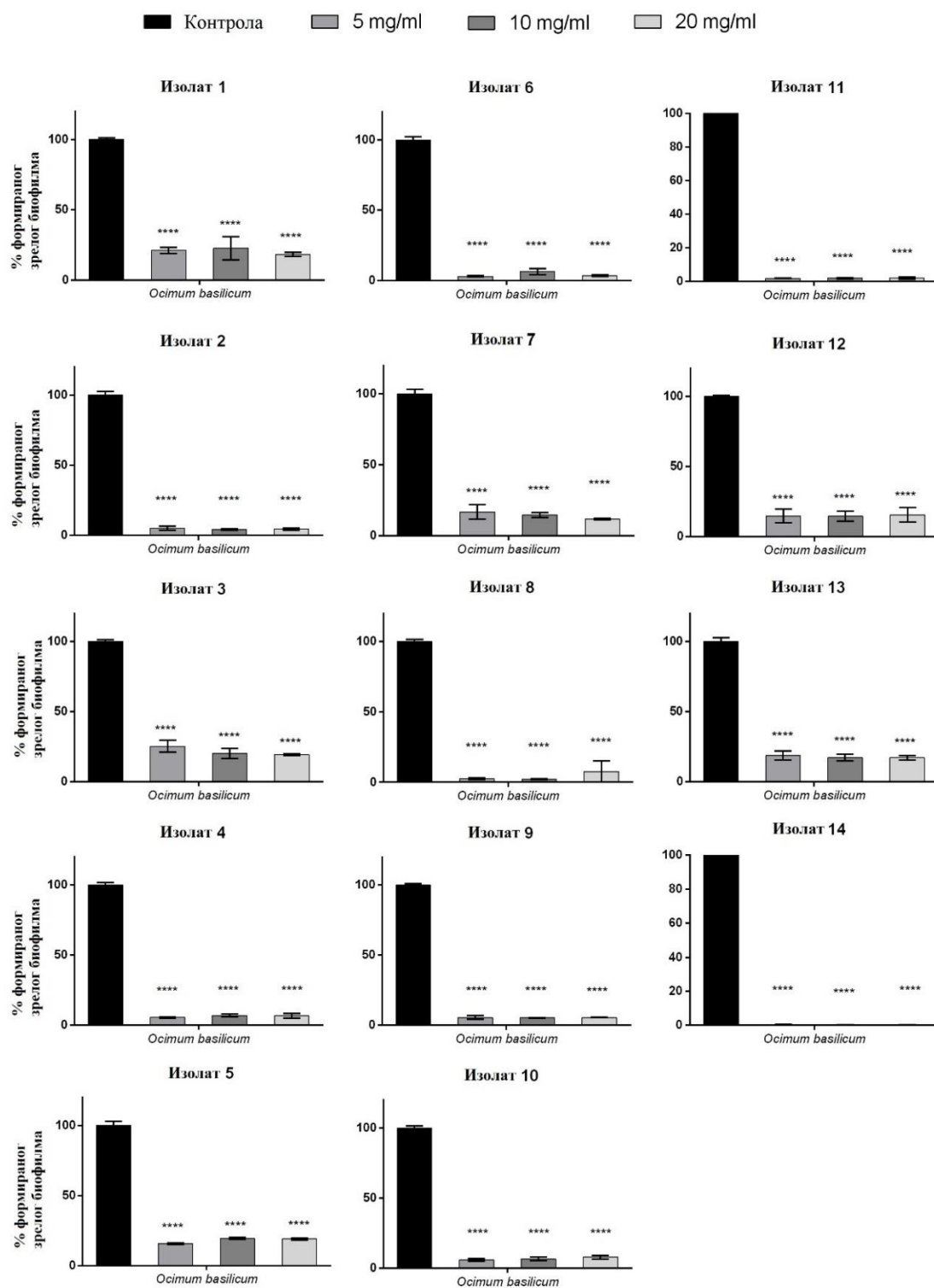
Да би се испитао потенцијал тестираних етарских уља на разградњу зрелог биофилма, изолати су гајени 24 h у микротитар плочама како би продуковали биофилм. Након тога додата су уља у различитим концентрацијама и плоче су остављене још 24 h на инкубацију. Концентрационо зависни ефекат није уочен ни у овој фази примене уља.

Резултати показују редукцију биофилма до 99,9% у односу на контролне културе у присуству уља босиљка. Након примене уља босиљка у концентрацији од 20 mg/ml, измерена је редукција биофилма од 80,8-99,9%. Концентрација од 20 mg/ml смањила је биофилм за 77,4% до 99,7%, док је примена уља у концентрацији од 5 mg/ml резултовала редукцијом биофилма од 74,7% до 99,9% (Слика 14).

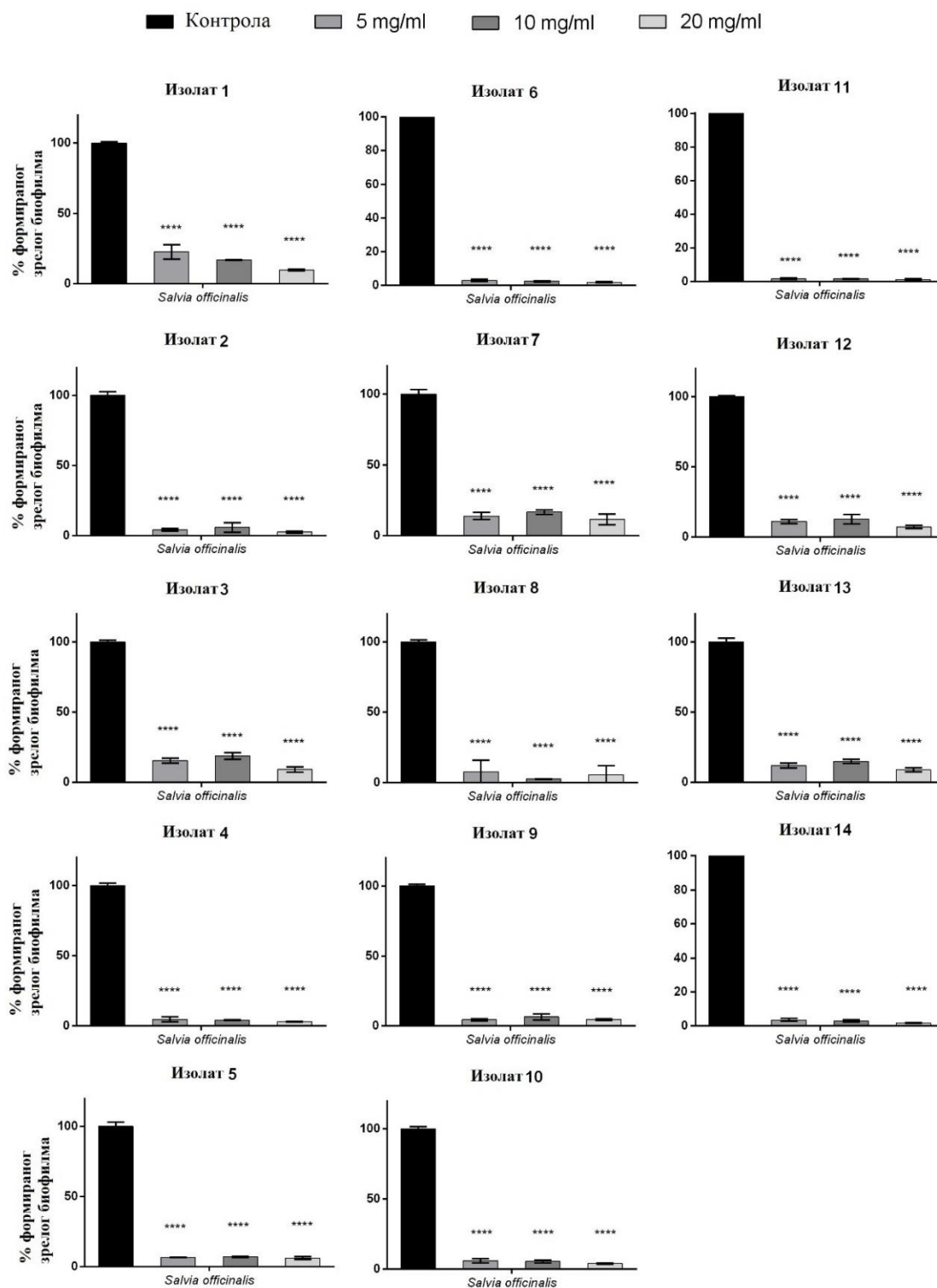
У случају примене уља жалфије зрео биофилм деградован је чак до 98,3%, што је примећено када је примењена најнижа тестирана концентрација уља. 81,3 до 98,4% зрелог биофилма деградовано је у случају примене уља жалфије у концентрацији 10 mg/ml, док је примена највише концентрације уља резултовала смањењем зрелог биофилма од 88,4 до 98,7% зависно од тестираног изолата (Слика 15).

Уље ртањског чаја такође је показало активност на зреле биофилмове, где је измерена редукција за 23,4-88,5% (Слика 16). Етарско уље при 2xМИК концентрацији редуковало је зреле биофилмове у опсегу 23,7-88,5%, МИК концентрација смањила је зреле биофилмове за 35,7-83,4%, док их је уље у МИК/2 деградовало за 23,4-82,2%. Највећи проценат деградације биофилма забележен је у случају сојева 12 (78,4-88,5%) и 13 (80-83,2%), где су све три концентрације показале значајан ефекат. Најнижи ефекат уље је остварило на зрео биофилм изолата бр. 7, где је уочено мање од 50% деградације при свим тестираним концентрацијама. Промотивни ефекат уља уочен је само при деловању на изолат 9 и то при МИК/2 концентрацији.

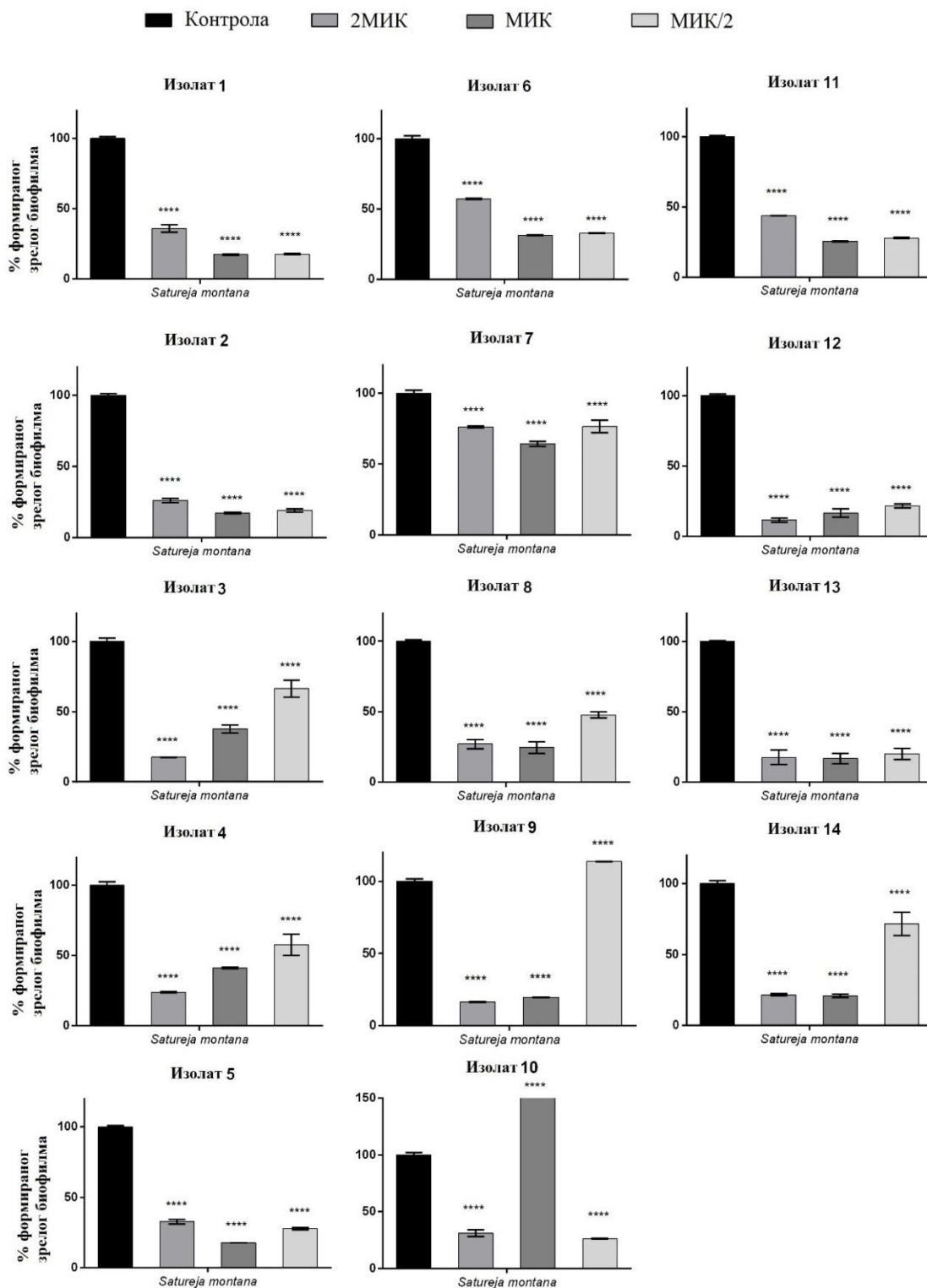
Етарско уље *O. basilicum* са сличним процентом линалола (35,1%) као код овде тестираног комерцијалног уља (34,3%) при МИК концентрацији инхибирало је продукцију биофилма и деградовало већ формиран биофилм соја *C. albicans* (Piras et al., 2018), док утицај уља босиљка са сличним саставом није испитиван на биофилмове сојева *P. aeruginosa*.



Слика 14. Продукција зрелог биофилма изолата *P. aeruginosa* након третмана етарским уљем *Ocimum basilicum*. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.



Слика 15. Продукција зрелог биофилма изолата *P. aeruginosa* након третмана етарским уљем *Salvia officinalis*. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.



Слика 16. Продукција зрелог биофилма изолата *P. aeruginosa* након третмана етарским уљем *Satureja montana*. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Zhou и сарадници (2013) су показали да еугенол (једна од доминантних компоненти комерцијалног етарског уља босиљка (5.8%)) при концентрацији од 400 μM инхибира продукцију биофилма соја *P. aeruginosa* PAO1 за 43%. Инхибиторни ефекат еугенола на формирање биофилма код *P. aeruginosa* потврђен је у истраживању Kim и сарадника (2015), док је исто истраживање показало да линалол нема утицај на продукцију биофилма. Међутим потврђено је да линалол, главна компонента комерцијалног етарског уља босиљка, инхибира формирање биофилма сојева *Acinetobacter baumannii* (Alves et al., 2016), *S. aureus* (Alviano et al., 2005), као и филаментозни раст и формирање биофилма код *C. albicans* (Hsu et al., 2013).

Етарско уље жалфије (α -тујон 28,5%, камфор 16,7% и 1,8-синеол 9,7%) слично по саставу овде испитиваном комерцијалном уљу (α - тујон 29,7%, камфор 16.6% и 1,8-синеол 9,2) при концентрацији од 0,5 mg/ml инхибирало је продукцију биофилма и довело до деградације већ формираног биофилма код сојева *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 и ATCC 49399 (Wijesundara & Rupasinghe, 2018). Утицај овог уља и доминантних компоненти није до сада испитиван на сојеве *P. aeruginosa*, али су претходна истраживања показале инхибиторни ефекат камфора на биофилмове сојева *S. aureus* и *S. lentus* (Al-Kinani & Al-Kaabi, 2019) и 1,8-синеола на продукцију биофилма врсте *S. pyogenes* (Vijayakumar et al., 2020).

Ефекат комерцијалног етарског уља *S. montana* богатог карвакролом (43,9%), *p*-цименом (15,3%) и тимолом (7,6%) на продукцију биофилма током 24 h и зреле биофилмове сојева *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 25922 и крвног изолата *L. monocytogenes* LM9 испитали су Vitanza и сарадници (2019). Сојеви су окарактерисани као јаки продуценти биофилма, а тестиране су субинхибиторне концентрације МИК/4 и МИК/8. Резултати су показали да је уље при овим концентрацијама довело до значајног смањења продукције биофилма свих тестираних изолата, али да није показало ефекат на деградацију зрелих биофилмова. Ефекат уља ртањског чаја са сличним саставом као овде испитаног комерцијалног уља (карвакрол (24,3%), тимол (15,5%), *p* цимен (12,2%), *O*-метил карвакрол (8,2%) и борнеол (6%)) није до сада испитиван на биофилмове сојева *P. aeruginosa*. Међутим ефекат доминантних компоненти уља ртањског чаја, карвакрола и тимола на формирање биофилмова и адхезију ћелија *P. aeruginosa* показан је у истраживању Soumya и сарадника (2011). Карвакрол при коцентрацији 2xМИК је инхибирао адхезију ћелија *P. aeruginosa* ATCC 27853 за 97%, док је тимол инхибирао за 89%. При деловању на *P. aeruginosa* СІР А22, карвакрол је показао инхибицију од 72%, а тимол 69%. Са друге стране када је испитан ефекат на формирање биофилма, карвакрол

(2xМИК) је редуковао продукцију биофилма за 90% код сојева *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* IL5 као и 62% при деловању на *P. aeruginosa* CIP A22. Тимол (2xМИК) је, такође, значајно редуковао продукцију биофилма сојева *P. aeruginosa* ATCC 27853 (86%), *P. aeruginosa* IL5 (70%) и *P. aeruginosa* CIP A22 (54%). Још једно истраживање показало је да тимол при концентрацијама од 400 и 600 µg/ml и карвакрол од 125-500 µg/ml значајно инхибирају продукцију биофилма резистентних изолата *P. aeruginosa* (Raei et al., 2017). Ефекат карвакрола на продукцију биофилма *P. aeruginosa* потврђен је и у истраживању Тариа-Rodriguez и сарадника (2017). Такође, показано је да и старска уља са високим садржајем тимола и карвакрола међу којима су *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *sipyleus* Boiss. var. *davisianus* Ronniger, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* и *Melaleuca alternifolia* такође значајно редукују формирање биофилма *P. aeruginosa* (Schillaci et al., 2013; Ceylan & Ugur, 2015; Comin et al., 2016).

Сва три уља показују ефекат на обе фазе формирања биофилма (пре адхезије и фаза после адхезије) и скоро у потпуности разграђују формиран биофилм. Међутим, мора бити наглашено да су нетретирани (контролни) биофилмови мерени након фазе адхезије били мање развијени у односу на биофилмове формиране када подлога није уклањана након периода адхезије. Такође, ефекат тестираних уља на биофилмове је био нижи након фазе адхезије, а у случају појединих изолата уочено је и повећање продукције биофилма.

Уочени ефекат је највероватније последица уклањања планктонских ћелија, које дефинитивно имају важну улогу у формирању биофилма и QS комуникацији. *Pseudomonas aeruginosa* поседује два зависна QS система (*las* и *rhl*) који заједно регулишу густину популације и раст, као и скуп фазно зависних фактора вируленције (Khalilzadeh et al., 2010). Развој биофилма почиње променом генске експресије, посредоване QS системом и N-ацил хомосеринским лактонима (АХЛ) као сигналним молекулима који дифундују у екстрацелуларну средину (Musk et al., 2005). Повећање ћелијске густине резултује повећањем концентрације АХЛ који се везују и активирају *las* и *rhl* рецепторе и даље регулишу експресију гена укључених у синтезу биофилма и осталих фактора вируленције (Kipnis & Sawa, 2006; Davies et al., 2012). еДНК представља важан састојак матрикса биофилма и неопходна је за адхезију и рану фазу развоја биофилма (Rasamiravaka et al., 2015). Замена подлоге у експериментима спроведеним у овом истраживању резултовала је ниском ћелијском густином услед уклањања планктонских ћелија, што је условило опадање концентрације сигналних молекула као

и еДНК и одложило формирање биофилма. Такође, могуће је да је додавање етарских уља у овој фази представљало окидач за активирање неких других гена кључних у повећању резистенције (на пример гена за ефлукс пумпе), повећану продукцију ЕПС, или активацију неких других механизма одговорних за већу резистенцију биофилма и чак промовишући ефекат.

На основу приказаних резултата ова три етарска уља имају веома значајан ефекат на продукцију биофилма, али и на зрео биофилм. Из овог разлога, она могу и требају бити примењена и као превентивно средство али и за третирање већ формираних, зрелих биофилмова. Ово је веома значајна информација за даље проучавање њихове примене у третману хроничних *P. aeruginosa* инфекција. Хроничне инфекције представљају најчешћу форму инфекција изазваних овом бактеријом, најизазовније су за лечење због високе отпорности и уједно представљају извор ћелија за рекуренцију након лечења. Чињеница да ниже концентрације показују већи ефекат (чак и до 4 пута већи) у редукцији биофилма у односу на више концентрације, даје јаку потпору за употребу ових уља с обзиром на још нижи ризик од токсичности.

Претходно споменути резултати заједно са резултатима добијеним у овом истраживању указују на значај (моно) терпена и терпеноидних компоненти етарских уља у контроли формирања биофилмова код *P. aeruginosa*. Познато је да биофилмови показују већу резистенцију због различитих фактора, попут смањене дифузије активних компоненти, инактивације или смањене пенетрације у дубље слојеве (Stewart, 2002). Због тога утврђена чињеница да природне компоненте могу да продру у биофилм, делују на метаболизам и смање развој биофилмова или деградују већ постојећи биофилм, представља значајну основу за будућа проучавања у циљу контроле комуникације ћелија и лечења хроничних инфекција изазваних биофилмовима.

4.9. Утицај етарских уља на различите типове покрета

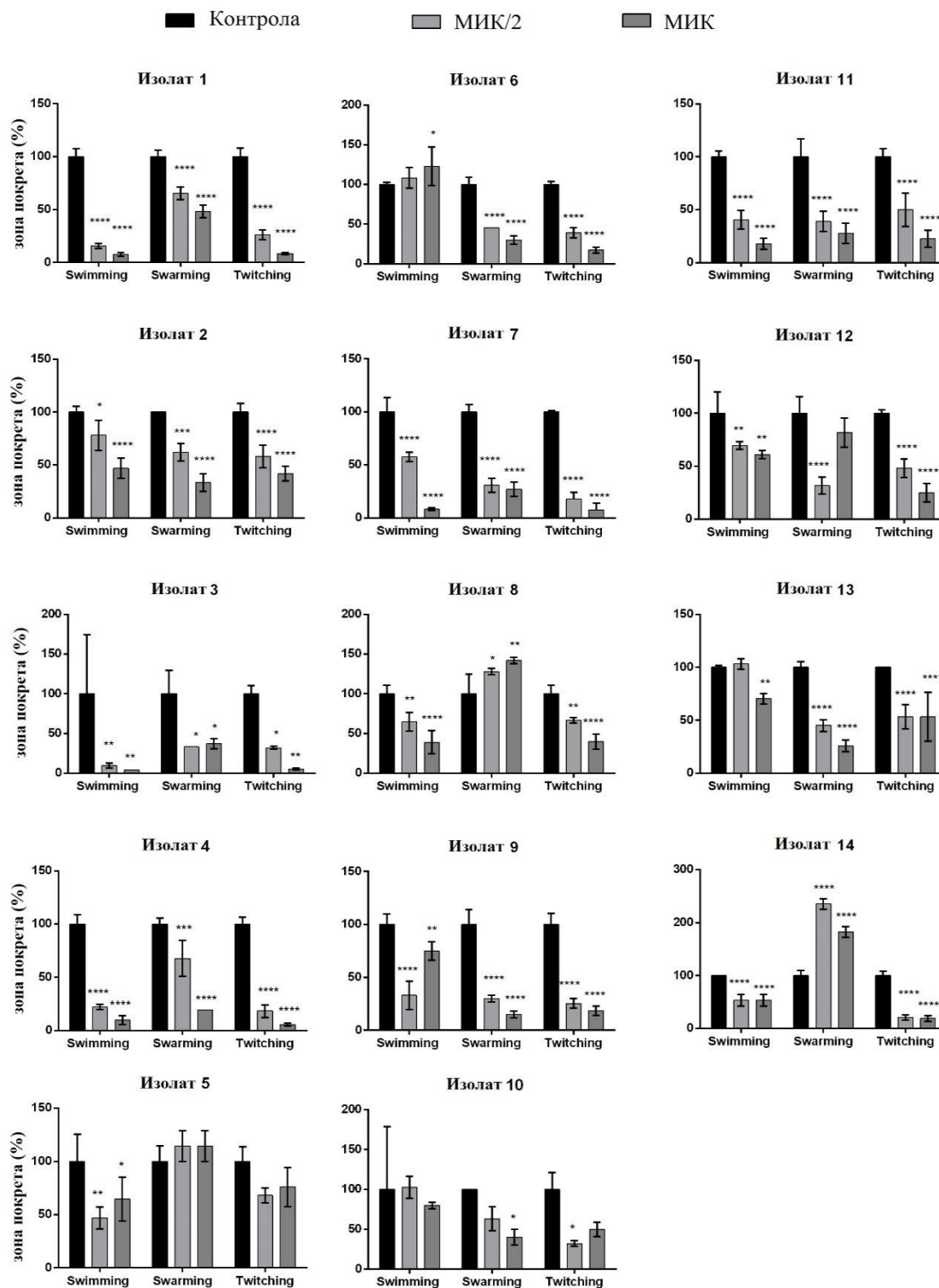
Способност етарских уља жалфије, босиљка и ртањског чаја да смање различите врсте покрета (eng. swimming, swarming и twitching) клиничких изолата *P. aeruginosa* је такође испитана.

Уље ртањског чаја није остварило статистички значајан ефекат на редукцију ни једног типа покрета код тестираних изолата, па резултати нису приказани.

Пливање (eng. swimming) бактерија у течној средини омогућено је захваљујући покретима поларно постављене флагеле. Ови покрети омогућавају хемотаксију и адхеренцију бактерија за површине (Pratt & Kolter, 1998), што омогућава формирање биофилма. Присуство уља босиљка у МИК и МИК/2 концентрацији довело је до инхибиције покрета пливања код 86,8% тестираних изолата, а резултати су приказани на Слици 17. Уље босиљка у МИК концентрацији смањило је покрете пливања до 95,8%, док је МИК/2 смањила покрете за 90%. Примена овог уља у МИК/2 концентрацији није редуковала овај тип покрета код изолата 6, 10 и 13, док је у случају примене МИК концентрације исти недостатак ефекта уочен код изолата 6.

Покрети ројења дефинисани су као брзо, координисано кретање бактерија по получврстим површинама. Етарско уље босиљка редуковало је зоне покрета ројења код 71,42% тестираних изолата, док је код 20% изолата повећало овај тип покрете (Слика 17). Када је ово уље било присутно у подлози (МИК и МИК/2 концентрације), редукција покрета није уочена код изолата 5, 8 и 14. Уље босиљка при МИК концентрацији редуковало је покрете ројења до 84,9% у поређењу са контролним зонама, док је МИК/2 концентрација редуковала зоне до 69%.

Осим покрета пливања, за формирање биофилма неопходни су и покрети трзања (O'Toole & Kolter, 1998). Покрети трзања дешавају се повезивањем и повлачењем пила типа IV, који играју значајну улогу у адхезији за супстрат и колонизацији (Woods et al., 1980). Уље босиљка при МИК и МИК/2 концентрацијама редуковало је зону покрета трзања код 93,3% тестираних изолата (Слика 17). При МИК концентрацији уље босиљка је редуковало овај тип покрета до 96,4%, док је МИК/2 концентрација редуковала покрете за 82%.



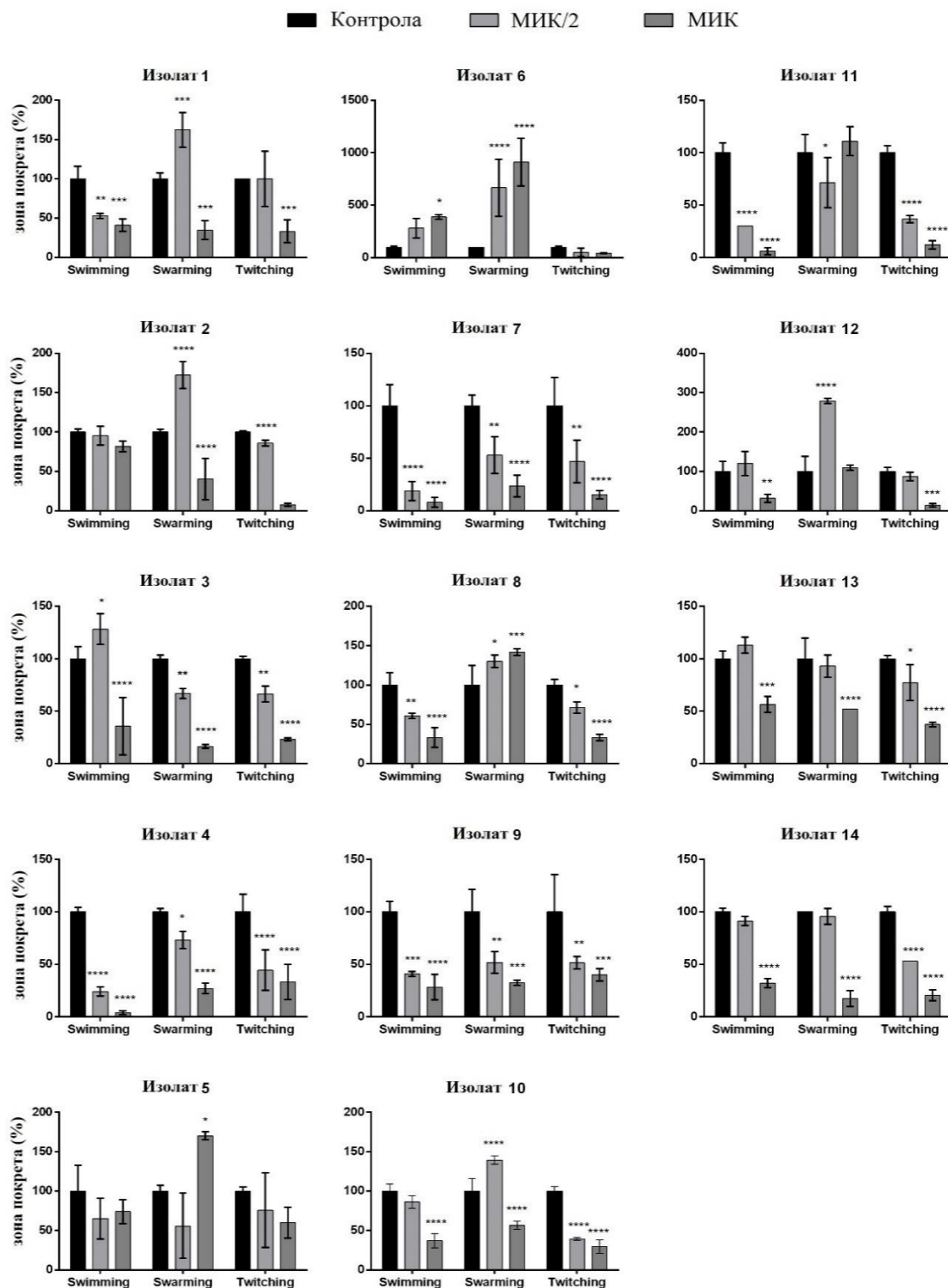
Слика 17. Промене зона покретљивости изражене у процентима након третмана уљем *Ocimum basilicum* у МИК и МИК/2 концентрацијама. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey post-hoc тестом. ****p < 0,0001; ***p < 0,001; **p < 0,005 *p < 0,05 у односу на контролу.

У случају примене уља жалфије, за покрете пливања добијени су слични резултати као и за уље босиљка, где је уочена редукција покрета пливања до 97% у присуству МИК концентрације и до 81% у присуству МИК/2 (Слика 18). Није уочена значајна промена овог типа покрета након примене овог уља у МИК и МИК/2 концентрацијама код изолата 2 и 5, док су у случају изолата 6, обе концентрације довеле до повећања зоне покрета.

Уље жалфије при МИК концентрацијама редуковало је покрете ројења до 83,5%, док је МИК/2 смањила зоне до 48%. Према резултатима приказаним на Слици 18., уље жалфије повећало је овај тип покрета код 46,6% изолата. Код изолата 3, 4, 7, 9 и 11 уочена је значајна редукција након примене уља у МИК/2 концентрацији.

Након примене истог уља, зона покрета трзања редукована је код 87% тестираних изолата (Слика 18). МИК концентрација редуковала је овај тип покрета и до 92%, док је МИК/2 испољила нешто нижи ефекат редукујући покрете до 63% зависно од тестираног изолата.

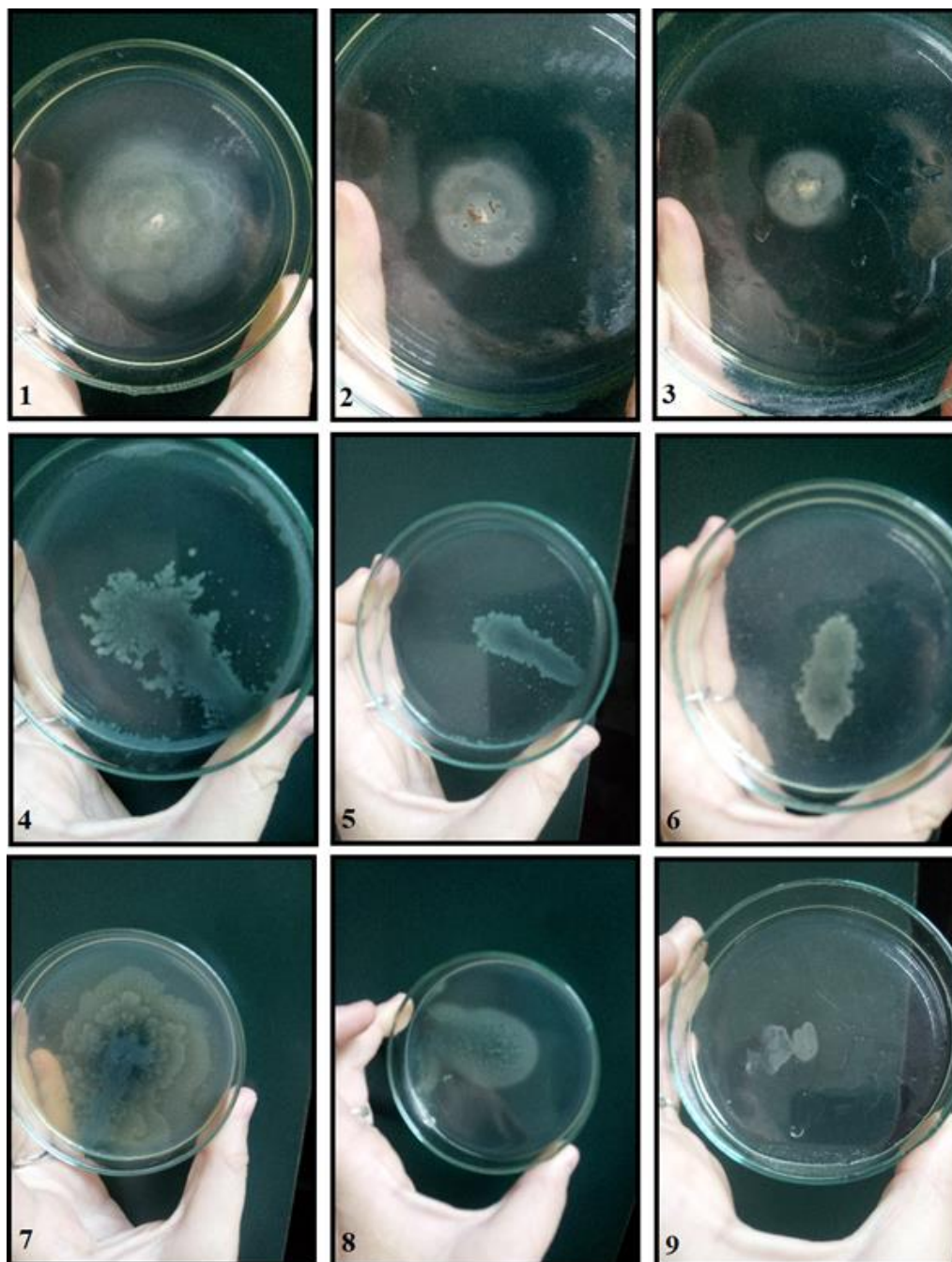
Претходно истраживање показало је да ћелије *P. aeruginosa* третиране уљем каранфилића остварују слабе флагеларне покрете (пливање) на агару. Husain и сарадници (2013) су показали да све третиране концентрације уља каранфилића значајно редукују покрете пливања (52-80%) у поређењу са нетретираним контролама. Bai и Vittal (2014) су у свом истраживању показали да су етарска уља *Rosmarinus officinalis*, *Murraya koenigii* и *Cuminum cyminum*, редуковала зону покрета пливања соја *P. aeruginosa* PAO1 за 22,2%, 44,4%, и 88,8%. Још један биљни метаболит, елагинска киселина, компонента *Camellia nitidissima* довела је до редукције покрета пливања до 10 mm (Yang et al., 2018). Значајна редукције зоне пливања показана је и од стране Radulović и сарадника (2018), где су тестирани комплекси злата (III) показали ефикасност на овај тип покрета смањујући зоне и до 12 mm. У претходном истраживању покрети трзања изолата *P. aeruginosa* пореклом из бриса рана су редуковани (до 15%), али нису потпуно блокирани комплексима злата (III) (Radulović et al., 2018). Етарска уља *Elettaria cardamomum*, *Trigonella graseum*, *R. officinalis*, *C. cyminum* и *M. koengii* показала су значајну редукцију овог типа покрета код соја *P. aeruginosa* PAO1, редукујући покрете и до 14,28%, 28,57%, 57,14%, 85,71% и 82,85% (Bai & Vittal, 2014). Уља босиљка и жалфије тестирана у овом истраживању остварила су већу зону редукције покрета у односу на горе наведена уља. Међутим, не постоје литературни подаци о утицају овде тестираних уља на овај тип покрета, па је немогуће упоредити резултате.



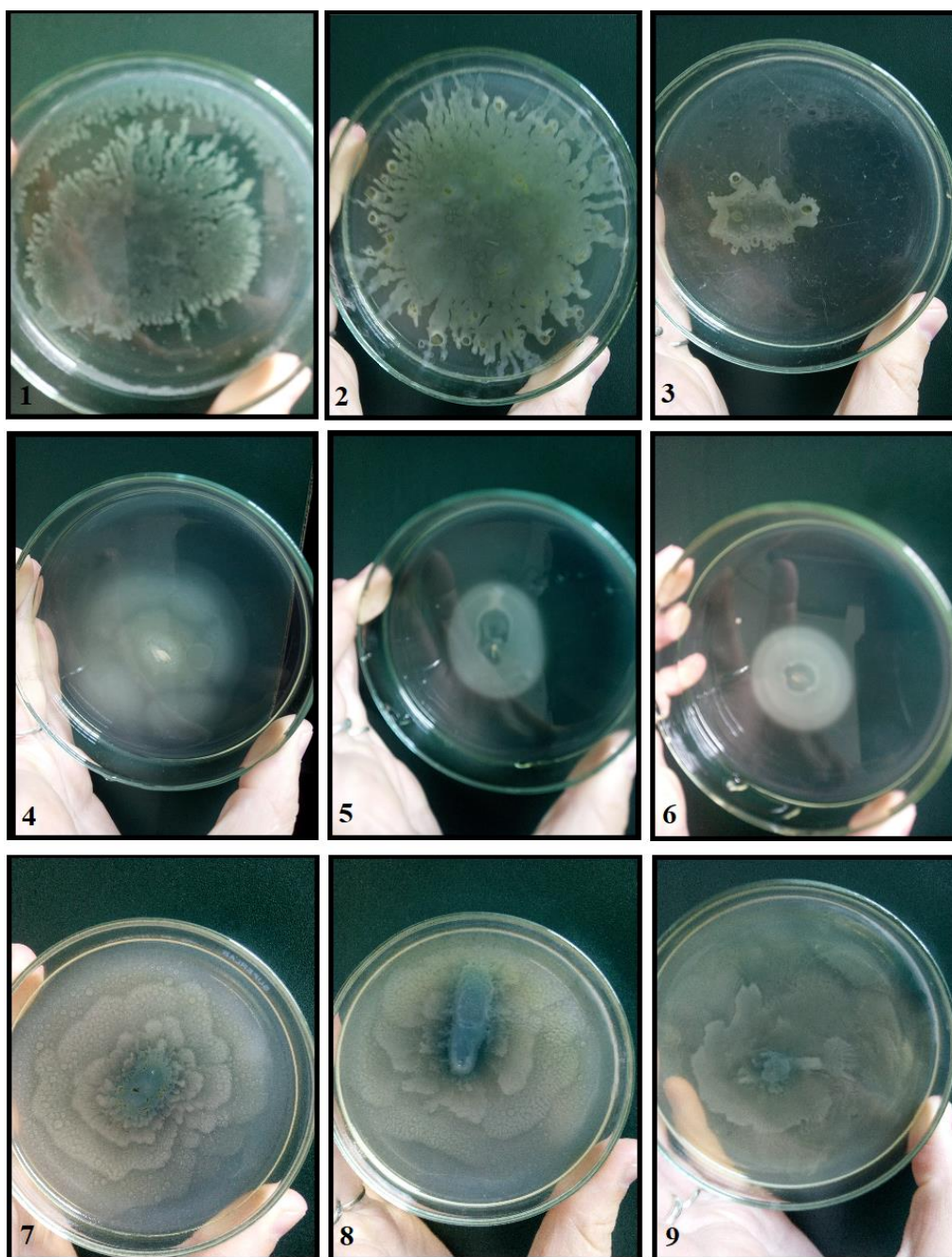
Слика 18. Промене зона покретљивости изражене у процентима након третмана уљем *Salvia officinalis* у МИК и МИК/2 концентрацијама. Резултати су приказани као средње вредности ± SD и анализирани су Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey post-hoc тестом. ****p < 0,0001; ***p < 0,001; **p < 0,005 *p < 0,05 у односу на контролу.

Резултати Vаттем и сарадника (2007) су показали да екстракти босиљка смањују покрете ројења до 35%, али у споменутом истраживању није испитан хемијски састав екстракта. Такође, комерцијално уље босиљка тестирано у овом истраживању показало је значајније већи проценат редукције покрета. Ефекат етарских уља жалфије и босиљка није до сада испитан на овај тип покрета. Међутим, инхибиција покрета ројења сојева *P. aeruginosa* показана је у случају примене *Curcuma longa* (Packiavathy et al., 2014), различитих биљних екстраката (Zahin et al., 2010), екстракта ђумбира (Kim & Park, 2013) екстракта зеленог чаја (Mihalik et al., 2008), зингерона (ванилил ацетон) (Rasamiravaka et al., 2015) и уља цимета (Kalia et al., 2015) на њихове ћелије. Етарска уља *R. officinalis*, *C. sumitum*, и *M. koengii* при концентрацијама од 12,5 mg/ml и 25 mg/ml смањила су покрете ројења соја *P. aeruginosa* PAO1 за 61,53, 61,53, и 84,61% (Bai & Vittal, 2014). Присуство уља цимета при концентрацији од 0,2 µl/ml инхибирало је покрете ројења. Овај ефекат уочен је и за цинамалдехид и еугенол (доминантне компоненте етарског уља цимета) (Kalia et al., 2015). Овде испитано етарско уље босиљка такође садржи еугенол као једну од главних компоненти, па се смањење овог типа покрета може бар делимично преписати еугенолу. Изолати 5, 8 и 14 показали су повећање покрета ројења у присуству уља босиљка, док је исти ефекат уочен код изолата 1, 2, 5, 6, 8, 10 и 12 у присуству уља жалфије. Сличне резултате добили су и Radulović и сарадници (2018), када су показали да примена цис-платине и тестираних антибиотика у субинхибиторним концентрацијама повећава покрете ројења. Пошто покрети ројења представљају ефективну стратегију у присуству антимикуробних агенаса (Butler et al., 2010), повећање овог типа покрета у присуству етарских уља може бити описано као механизам одбране соја *P. aeruginosa*.

Резултати добијени за покретљивост изолата су очекивани, јер тестиране супстанце утичу и на формирање биофилма. Претходна истраживања су показала да зингерон, главна компонента сувог корена ђумбира, инхибира формирање биофилма и смањује сва три типа покрета (Rasamiravaka et al., 2015). Комплекси злата (III) такође показују активност на продукцију биофилма када се додају у фази пре адхезије ћелија и након адхезије и смањују покрете изолата *P. aeruginosa* и АТСС сојева (Radulović et al., 2018). Етарско уље каранфилића такође смањује формирање биофилма и покретљивост ћелија (Husain et al., 2013).



Слика 19. Покрети соја 1 *Pseudomonas aeruginosa*. 1 – Swimming покрети контрола, 2 - Swimming покрети при МИК концентрацији уља босиљка, 3 – Swimming покрети при МИК/2 концентрацији уља босиљка, 4 Swarming покрети контрола, 5 – Swarming покрети при МИК концентрацији уља босиљка, 6 – Swarming покрети при МИК/2 концентрацији уља босиљка 7 – Twitching покрети контрола, 8 – Twitching покрети при МИК концентрацији уља босиљка, 9 – Twitching покрети при МИК/2 концентрацији уља босиљка.



Слика 20. Покрети соја 1 *Pseudomonas aeruginosa*. 1 – Swimming покрети контрола, 2 - Swimming покрети при МИК концентрацији уља жалфије, 3 – Swimming покрети при МИК/2 концентрацији уља жалфије, 4 Swarming покрети контрола, 5 – Swarming покрети при МИК концентрацији уља жалфије, 6 – Swarming покрети при МИК/2 концентрацији уља жалфије 7 – Twitching покрети контрола, 8 – Twitching покрети при МИК концентрацији уља жалфије, 9 – Twitching покрети при МИК/2 концентрацији уља жалфије.

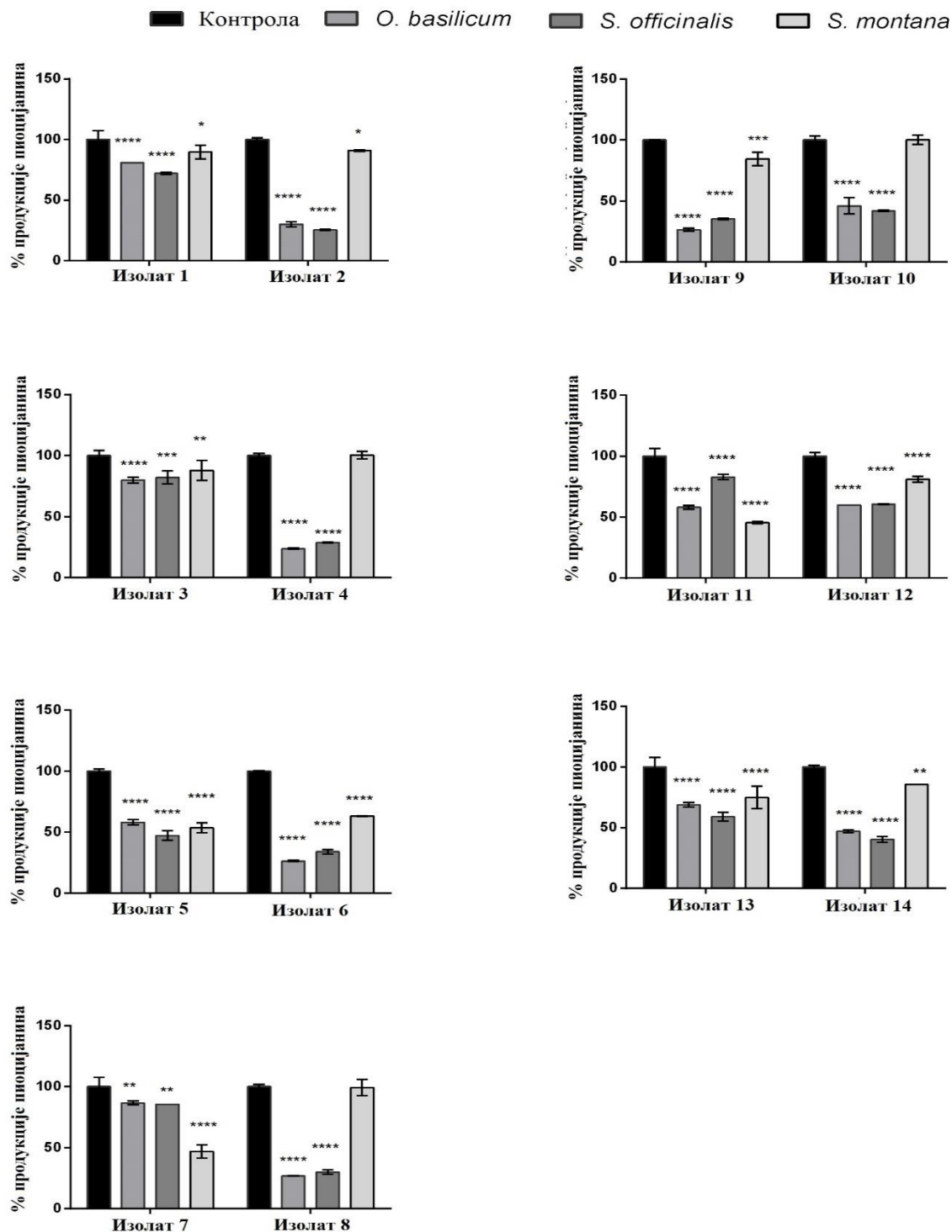
4.10. Утицај етарских уља на продукцију пиоцијанина

Пеоцијанин је плаво-зелени пигмент који продукује сој *P. aeruginosa* и који првенствено дозвољава бактеријама да се развијају у одређеном станишту. Представља мало хетероциклично једињење са биолошким активностима које помажу у развоју биофилма *P. aeruginosa* (Price-Whelan et al., 2006). Пеоцијанин такође инхибира раст неколико врста бактерија и гљива (Janabi, 2018). Продукција овог пигмента је регулисана генима који су под контролом QS механизма. Представља главни фактор вируленције одговоран за оксидативни стрес плућних епителних ћелија што на крају доводи до оштећења плућа, респираторне инсуфицијенције и смрти (O'Malley et al., 2003).

У овом истраживању сви тестирани изолати продуковали су пеоцијанин. Циљ је био испитати ефекат тестираних уља на синтезу и секрецију овог пигмента повезаног са вируленцијом. Резултати продукције пеоцијанина у присуству уља и контролним узорцима (без уља) приказани су на Слици 21.

Присуство уља босиљка и жалфије у МИК/2 концентрацијама смањило је продукцију овог пигмента код свих тестираних изолата, док је уље ртањског чаја показало активност код 11 од укупно 14 тестираних изолата. Уље босиљка смањило је продукцију пеоцијанина од 13,3-76,34% зависно од изолата. Присуство уља жалфије у подлози смањило је продукцију пеоцијанина до 74,48%. Уље ртањског чаја показало је нешто слабију активност, редукујући продукцију пеоцијанина од 9,1 до 54,4%.

Претходна истраживања показале су да екстракти зеленог чаја значајно смањују формирање пеоцијанина, чак до 97% (Mihalik et al., 2008), док екстракти босиљка смањују продукцију овог пигмента до 78% (Vattem et al., 2007). Етарско уље цимета показало је редукујућу продукцију пеоцијанина до 22% при концентрацији од 0,2 $\mu\text{l/ml}$ у односу на контролу (Kalia et al., 2015). Примећено је и смањење продукције пеоцијанина од 37% до 75% при различитим субинхибиторним концентрацијама етарског уља каранфилића (Husain et al., 2013). На основу литературних података уочено је да нема истраживања које су испитивале утицај уља босиљка, жалфије и ртањског чаја на продукцију пеоцијанина клиничких изолата *P. aeruginosa*. Међутим, показано је да главне компоненте овде тестираних комерцијалних етарских уља утичу на продукцију пеоцијанина.



Слика 21. Продукција пиноцијанина у присуству комерцијалних етарских уља *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* и *Satureja montana*. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD. Анализирани Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey post hoc тестом. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Према истраживању Ahmad и сарадника (2015), тујон и линалол, компоненте присутне у овде тестираним уљима жалфије и босиљка довеле су до инхибиције продукције пиоцијанина соја *P. aeruginosa* ATCC 27853 за ~75% и ~50%, док су тимол и карвакрол присутне у етарском уљу ртањског чаја као доминантне компоненте инхибирале продукцију пиоцијанина за ~32% и ~22%. Tapia-Rodriguez и сарадници (2017) су показали да је карвакрол редуковао пиоцијанин за 60%. Дакле, осетљивост свих тестираних изолата на комерцијална етарска уља жалфије, босиљка и ртањског чаја при МИК/2 концентрацијама може се повезати са присуством α -тујона, линалола, карвакрола и тимола.

Претходно је показано да етарска уља и неколико главних састојака етарских уља поседују способност да ометају QS механизам и факторе вируленције *P. aeruginosa*. Показано је да етарско уље каранфилића (са високим садржајем еугенола) модификује QS систем и формирање биофилма, смањује активност ензима, продукцију пиоцијанина и покретљивост ћелија (Husain et al., 2013). Потврђено је да еугенол (који се такође налази у комерцијалном уљу босиљка тестираном у овом истраживању) инхибира продукцију фактора вируленције, укључујући пиоцијанин и формирање биофилма соја *P. aeruginosa* (Zhou et al., 2013; Kim et al., 2015). Еугенол при концентрацији од 50 μ M инхибирао је продукцију пиоцијанина соја *P. aeruginosa* PAO1 за 56%. Пошто је продукција пиоцијанина регулисана *nQS* системом, можемо закључити да еугенол директно инхибира PQS стимулисану транскрипцију (Zhou et al., 2013).

4.11. Тип интеракције између антимикуробних агенаса

Резистенција *P. aeruginosa* на флуорокинолоне, групу антибиотика којој припада ципрофлоксацин, може бити последица мутација у регулацији ефлукс система, или мутација у топоизомеразним циљаним местима (*gyrA* и *parC*). У комбинацији, ове мутације повећавају и резистенцију на друге лекове (Rossolini & Mantengoli, 2005). Пораст учесталости резистенције и недостатак нових антибиотика довео је до развоја алтернативних начина за сузбијање инфекција изазваних овим сојевима. Употреба комбиноване терапије показала се као боље решење у поређењу са употребом једног антимикуробног агенса у терапији бактеријске резистенције. Велики број *in vitro* истраживања показује да етарска уља и њихове активне компоненте поседују антимикуробни потенцијал и могу се користити као помоћни агенси у лечењу различитих

инфекција (Serrano et al., 2011; Akthar et al., 2014; Calo et al., 2015; Tardugno et al., 2018; Tariq et al., 2019; Santos et al., 2019; Vitanza et al., 2019; Cáceres et al., 2020). Компоненте етарског уља са антибиотиком који се користи у терапији могу деловати синергистички на више начина: истовременим деловањем на више циљних места, физичко-хемијским интеракцијама и инхибицијом механизма резистенције код бактерија (Langeveld et al., 2014).

Ефекат тестираних етарских уља на повећање ефикасности антибиотика ципрофлоксацина, као и тип интеракције између тестираних етарских уља на клиничке изолате *P. aeruginosa* одређен је методом шаховске табле (енг. checkerboard assay). Тестиране су комбинације босиљак/ципрофлоксацин (БЦ), жалфија/ципрофлоксацин (ЖЦ), ртањски чај/ципрофлоксацин (РЦ) и резултати су приказани у Табели 14.

Након примене комбинације БЦ, синергизам је уочен код 64,28% тестираних изолата, док је адитивни ефекат уочен код два изолата (изолат 6 и 10). Изолати 7, 11 и 13 показали су нешто већу резистенцију у поређењу са осталим изолатима, где су израчунати ФИКИ индекси показали индиферентни тип интеракције између босиљка и ципрофлоксацина.

Са друге стране, комбинација ЖЦ показала је нешто слабији ефекат у односу на БЦ комбинацију. Жалфија и ципрофлоксацин показали су синергистички ефекат код 42,86% и адитивни код 28,57% тестираних изолата. Изолати 8, 11 и 14 показали су исту осетљивост на ову комбинацију као и на агенсе појединачно.

Уље ртањског чаја у комбинацији са ципрофлоксацином (РЦ) дало је ФИКИ вредности у опсегу од 0,08-1,25 зависно од изолата. Синергизам је уочен код 57,14% изолата, док је адитивни ефекат уочен код изолата 7, 9 и 10. Иста комбинација показала је индиферентни ефекат при деловању на изолате 2, 6 и 14.

Имајући у виду висок проценат синергизма и одсуство антагонистичког ефекта, приказани резултати су обећавајући и указују на висок потенцијал уља босиљка, жалфије и ртањског чаја као агенса који могу да повећају ефикасност ципрофлоксацина у терапији хроничних инфекција изазваних бактеријом *P. aeruginosa*.

Једино истраживање које је испитивало ефекат етарског уља жалфије у комбинацији са антибиотицима на *P. aeruginosa*, показује висок потенцијал уља жалфије у повећању ефикасности неколико конвенционалних антибиотика (El-Hosseiny et al., 2014).

Табела 14. Тип интеракције између комерцијалних уља и антибиотика ципрофлоксацина

Изолати	Уље босиљка/ ципролоксацин (БЦ)		Уље жалфије/ ципрофлоксацин (ЖЦ)		Уље ртањског чаја/ ципрофлоксацин (РЦ)	
	ФИКИ	Тип интеракције	ФИКИ	Тип интеракције	ФИКИ	Тип интеракције
Изолат 1	0,38	С	0,38	С	0,17	С
Изолат 2	0,25	С	2,00	И	1,25	И
Изолат 3	0,09	С	0,16	С	0,49	С
Изолат 4	0,13	С	0,17	С	0,19	С
Изолат 5	0,12	С	0,15	С	0,5	С
Изолат 6	0,53	Ад	0,53	Ад	1,01	И
Изолат 7	1,03	И	0,53	Ад	0,7	Ад
Изолат 8	0,38	С	1,25	И	0,08	С
Изолат 9	0,38	С	0,38	С	0,75	Ад
Изолат 10	0,75	Ад	0,56	Ад	0,53	Ад
Изолат 11	1,06	И	1,13	И	0,12	С
Изолат 12	0,13	С	0,16	С	0,28	С
Изолат 13	1,03	И	0,53	Ад	0,5	С
Изолат 14	0,38	С	1,13	И	1,12	И

ФИКИ-индекс фракционе инхибиторне концентрације; С- Синергистички ефекат $ФИКИ \leq 0,5$; Ад- Адитивни ефекат $0,5 < ФИКИ \leq 1$; И- Индиферентан ефекат $1 < ФИКИ \leq 2$; Ан- Антагонистички ефекат $ФИКИ > 2$

У поменутом истраживању (El-Hosseiny et al., 2014) иако уље жалфије није показало активност на сој *P. aeruginosa*, појачало је активност антибиотика пиперацилина, меропенема и гентамицина, док је у комбинацији са норфлоксацином остварило антагонистичку интеракцију. Још једно истраживање показало је могућност уља жалфије да повећа активност цiproфлорксацина у контроли инфекција изазваних MRSA сојевима (Milenković et al., 2015). Са друге стране, уље жалфије остварило је антагонистичку реакцију са цефотаксимом на *E. coli* ATCC 25922 (Adrar et al., 2016). Нешто нижи ефекат овде приказаног уља жалфије у повећању активности цiproфлорксацина у поређењу са уљем босиљка може бити последица хемијског састава уља. Резултати хемијске карактеризације уља показују да су α -тујон (29,7%), камфор (16,6%) и еукалиптол (1,8-синеол) (9,2%) доминантне компоненте комерцијалног уља жалфије, док су (*E*)-анетол (39,4%), линалол (34,3%), еугенол (5,8%) и лонгифолен (6,2%) доминантне компоненте комерцијалног уља босиљка. Показано је да терпенски етар 1,8-синеол има мању способност да промени осетљивост патогена на антибиотик због недостатка слободних хидроксилних група, што није случај са фенолним етром еугенолом и неким монотерпенским алкохолима (линалол и гераниол). Хидроксилна група еугенола одговорна је за инхибицију ензима попут АТФ-азе, хистидин декарбоксилазе или протеазе (Griffin et al., 1999). Показано је да еугенол повећава активност ампицилина, полимиксина, хлорамфеникола, пеницилина, еритромицина, ванкомицина, норфлоксацина и тетрациклина на сој *P. aeruginosa* (Nemaiswarya & Doble, 2009). Неке компоненте етарских уља мењају осетљивост Грам негативних бактерија на лекове интерагујући са ефлукс пумпама. Прекомерна активност ефлукс пумпи доводи до поновне осетљивости на одређени лек. Овај механизам деловања карактеристичан је за β -лактамске антибиотике и флуорохинолоне (где спада цiproфлорксацин) (Chouhan et al., 2017).

Резултати добијени у овом истраживању у сагласности су са резултатима истраживања коју су спровели Silva и сарадници (2016). Тестирана комбинација *O. basilicum* и цiproфлорксацина остварила је синергистички тип интеракције на клинички изолат *P. aeruginosa* 1662339, док је иста комбинација показала индиферентни ефекат на сој *P. aeruginosa* ATCC 25853. Mahmoud и сарадници (2016) су показали да је комбинација босиљак/цiproфлорксацин била ефикасна код 88,89% од укупно 9 тестираних изолата *P. aeruginosa*.

Интеракција етарског уља *S. montana* са цiproфлорксацином није до сада испитана, али су Vitanza и сарадници (2019) испитали тип интеракције овог уља са

гентамицином. Поменуто истраживање (Vitanza et al., 2019) показује синергистички ефекат између уља и гентамицина на Грам-негативне бактерије *E. coli* у комбинацији 1/4 МИК етарског уља и 1/16 МИК гентамицина (ФИКИ \leq 0,5). Аутори су претпоставили да је синергистички ефекат резултат оштећења мембране коју је изазвало етарско уље што је довело до поремећаја мембранског потенцијала и олакшаног уласка гентамицина у ћелију. Са друге стране истраживања су показала да тимол (једна од доминантних компоненти овде тестираног уља ртањског чаја) у комбинацији са ципрофлоксацином остварује синергистички ефекат на сој *P. aeruginosa* (Grădinaru et al., 2018). Осим тога, истраживања етарских уља чије су главне компоненте тимол и карвакрол, такође показују синергистички тип интеракције између ових уља и ципрофлоксацина. Етарско уље ајована (*Trachyspermum ammi*), чија је главна компонента тимол, испољило је синергистички ефекат са ципрофлоксацином на сој *P. aeruginosa* АТСС 27853 (ФИКИ вредност 0,37) (Grădinaru et al., 2018). Етарска уља мајчине душице (*Thymus maroccanus* и *Thymus broussonetii*), у чијем саставу доминира карвакрол, су такође показала синергистички ефекат у комбинацији са ципрофлоксацином при деловању на клинички изолат *P. aeruginosa* (Fadli et al., 2012).

Ципрофлоксацин остварује своју активност тако што инхибира ензиме, ДНК гиразе и топоизомеразе IV, који су неопходни за процесе репликације, транскрипције и рекомбинације. Фенолне компоненте попут тимола осим што реагују са ћелијским зидом могу да делују и на друга циљна места у ћелији попут синтезе нуклеинских киселина, активности ензима, усвајања нутријената и стварања енергије. Синергистичка интеракција између етарских уља богатих фенолним компонентама и антибиотика ципрофлоксацина највероватније није остварена само способношћу уља да мења својства ћелијске мембране, већи и другим механизмима попут способности да делују на метаболизам, активност ензима и побољшавања дифузије антибиотика кроз мембрану (Grădinaru et al., 2018). Осим главних фенолних компоненти, антибактеријској активности доприносе и мање заступљене компоненте уља. Однос етарског уља и антибиотика у комбинацији такође утиче на тип остварене интеракције (Van Vuuren et al., 2009).

На основу наведених чињеница комбинована терапија антибиотика и компоненти етарских уља које могу да повећају пермеабилност мембране или на различите начине учине ћелију сензитивнијим на антибиотике, делује као перспективна стратегија за лечење инфекција изазваних мултирезистентним бактеријама, каква је *P. aeruginosa*.

4.12. Осетљивост изолата *Klebsiella* spp. на антибиотике

Како би се одредила осетљивост на антибиотике, клинички изолати *Klebsiella* spp. тестирани су на спектар антибиотика међу којима су ампицилин (АМП), гентамицин (ГЕН), цiproфлорксацин (ЦПР), левофлорксацин (ЛВХ), фосфомицин (ФОС), цефалексин (ЦЕХ), цефотаксим (ЦТХ), цефуроксим (ЦХМ), цефиксим (ЦФЕ), цефтазидим (ЦАЗ), цефепим (ЦФПЕ), имипенем (ИМП), меропенем (МЕР), триметоприм-сулфаметазол (СХТ) и амоксицилин-клавулонска киселина (АМЦ). Након мерења зона инхибиције око дискова, резултати су интерпретирани као вредности (С-осетљив, И-интермедијарно осетљив и Р-резистентан) на основу EUCAST v 5.0 критеријума и приказани у Табели 15.

Сви тестирани изолати показали су резистенцију на више од једног антибиотика. Изолати 1, 2 и 3 показали су резистенцију на два антибиотика и окарактерисани су као сензитивни изолати, док је 6 изолата (4, 5, 6, 7, 8 и 9) било резистентно на пет и више антибиотика и можемо их сматрати мултирезистентним изолатима. Изолати 1 и 3 били су резистентни на ампицилин и фосфомицин, а изолат 2 на ампицилин и цiproфлорксацин. Изолати 4, 5 и 7 показали су резистентност на 13 од укупно 15 тестираних антибиотика, изолат 6 био резистентан на 6 од 11 антибиотика, изолат 8 на 8 од 11 тестираних антибиотика, док је изолат 9 показао резистентност на 5 од 9 тестираних антибиотика. Фосфомицин и амоксицилин-клавулонска киселина су показали слабу активност на тестиране изолате, где је 6 изолата показало резистенцију на ове антибиотике.

Уочљива је чињеница да су на ампицилин били резистентни сви тестирани изолати и овај антибиотик не би требало користити у третману инфекција изазваних сојевима рода *Klebsiella*. Ова чињеница се поклапа са резултатима које су добили Nirwati и сарадници (2019), где је од 167 изолата 163 показало резистенцију на ампицилин.

Сви ови подаци указују на алармантну чињеницу растуће резистенције *Klebsiella* spp. сојева на антибиотике због њихове неадекватне примене. До сада је потврђено неколико различитих механизма антибиотске резистенције код ових врста.

Резистентност на β -лактамске антибиотике врсте рода *Klebsiella* постижу захваљујући поседовању β -лактамаза, ензима чија је улога хидролиза и уништавање прстена β -лактамских антибиотика. Гени који кодирају ове ензиме могу се наћи на хромозомалној ДНК или плазмиду (Fournomiti et al., 2015; Martin & Bachman, 2018). Бета лактамазе проширеног спектра деловања (енг. *extended spectrum beta lactamases*) су

ензими одговорни за хидролизу цефалоспорина III и IV генерације, међу којима су цефотаксим и цефтазидим, али не хидролишу цефамидине и карбапенеме. Гени који кодирају ове ензиме налазе се на плазмиду (Martin & Bachman, 2018; Milić & Miljač, 2019). Резистенција на карбапенеме регулисана је углавном помоћним генима, али може бити повезана и са мутацијама на главним генима. Промена регулације ефлуке пумпи у комбинацији са променама порина у спољашњој мембрани и хиперпродукцијом AmpC β -лактамаза доводи до резистенције на овај тип антибиотика. Највише забрињава механизам резистенције на карбапенеме, јер је све чешћа употреба ових антибиотика довела до еволуције плазмидом посредованих карбапенемаза. То су ензими који разлажу све β -лактамске антибиотике укључујући и карбапенеме. Ово је најчешћи тип ензима код *K. pneumoniae* (Martin & Bachman, 2018).

Прекомерна употреба аминокликозидних антибиотика (међу које спадају амикацин и гентамицин) довела је до еволуције механизма резистенције који укључују ензиме са различитим активностима као што су ацетилација, аденилација или фосфорилација и промену пермеабилности мембране. Најновија истраживања показују да је сој *K. pneumoniae* развио нови механизам резистенције на готово све аминокликозиде. Овај механизам укључује 16S рРНК метилазу, ензим који спречава аминокликозиде да се вежу за своја 16 S рРНК циљна места (Navon-Venezia et al., 2017).

Хинолони, група антибиотика међу које спадају ципрофлоксацин и левофлоксацин, користе се од 1960. године и њихова употреба се све више повећавала током година што је довело до еволуције механизма резистенције на ову групу антибиотика. Ови антибиотици делују на топоизомеразе и блокирају ДНК репликацију. Механизми резистенције укључују мутације гена на циљаним местима, повећану продукцију МДР пумпи (енг. *multidrug resistance pumps*), модификацију ензима и/или циљаних протеина (Navon-Venezia et al., 2017).

Табела 15. Осетљивост изолата *Klebsiella* spp. на антибиотике

Изолати	АМП	ГЕН	ЦПР	ЛВХ	ФОС	ЦЕХ	ЦТХ	ЦХМ	ЦФЕ	ЦФТ	ЦФПМ	ИМП	МЕР	СХТ	АМЦ
Изолат 1	Р	И	С	С	Р	С	С	С	С	/	/	/	/	С	С
Изолат 2	Р	С	Р	/	С	С	С	С	С	/	/	/	/	С	С
Изолат 3	Р	С	С	/	Р	С	С	С	С	/	/	/	/	С	С
Изолат 4	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	С	С	Р	Р
Изолат 5	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	С	С	Р	Р
Изолат 6	Р	Р	Р	Р	Р	С	С	С	С	/	/	/	/	И	Р
Изолат 7	Р	Р	Р	Р	Р	С	Р	Р	Р	Р	Р	С	С	Р	Р
Изолат 8	Р	Р	Р	С	/	/	/	Р	/	Р	Р	С	С	Р	Р
Изолат 9	Р	/	И	/	/	/	/	Р	/	Р	Р	С	С	И	Р

Ампицилин (АМП), Гентамицин (ГЕН), Ципрофлоксацин (ЦПР), Левофлоксацин (ЛВХ), Фосфомицин (ФОС), Цефалексин (ЦЕХ), Цефотаксим (ЦТХ), Цефуросим (ЦХМ), Цефиксим (ЦФЕ), Цефтазидим (ЦФТ), Цефепим (ЦФПМ), Имипенем (ИМП), Меропенем (МЕР), Триметоприм-сулфаметазол (СХТ), Амоксицилин-клавулонска киселина (АМЦ)

/- није тестирано, С-осетљив, И-слабо осетљив, Р-резистентан.

4.13. Антимикробна активност етарских уља босиљка, жалфије и ртањског чаја на изолате рода *Klebsiella*

Антибактеријска активност тестираних уља босиљка, жалфије, ртањског чаја и антибиотика ципрофлоксацина одређена је микродилуционом методом и резултати су приказани у Табели 16. Етарско уље босиљка показало је активност у опсегу 2,5-10 mg/ml док је уље ртањског чаја било активно у опсегу од 1,25 до 5 mg/ml, зависно од тестираног изолата. Концентрације уља жалфије кретале су се изнад 20 mg/ml, па се с обзиром на јако високе активне концентрације ово уље се може сматрати неактивним на изолате *Klebsiella* spp. МИК вредности антибиотика ципрофлоксацина биле су у опсегу 0,0004-0,1 µg/ml.

На уље босиљка најсензитивнији је био изолат 4, где је МИК била 2,5 mg/ml. Раст изолата 3, 6, 7 и 9 био је инхибиран при концентрацији од 5 mg/ml, док је код изолата 1, 2, 5 и 8 МИК износила 10 mg/ml. Етарско уље ртањског чаја показало је највећу ефикасност у случају изолата 1, 4, 5 и 8 где је минимална инхибиторна концентрација била 1,25 mg/ml, док је концентрација од 2,5 mg/ml инхибирала раст изолата 3, 6 и 9. Као најрезистентнији изолати на уље ртањског чаја показали су се изолати 2 и 7, чији је раст био инхибиран при концентрацији од 5 mg/ml.

Табела 16. Антимикробна активност комерцијалних уља и антибиотика ципрофлоксацина

Изолати	Порекло	<i>O. basilicum</i> <i>S. montana</i> <i>S. officinalis</i>			Ципрофлоксацин МИК (µg/ml)
		МИК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	
1	Узорак урина	10	1,25	>20	0,0004
2	Узорак урина	10	5	>20	0,0023
3	Узорак урина	5	2,5	>20	0,0004
4	Узорак урина	2,5	1,25	>20	0,0188
5	Узорак урина	10	1,25	>20	0,1000
6	Узорак урина	5	2,5	>20	0,1000
7	Узорак урина	5	5	>20	0,0500
8	Брис ране	10	1,25	>20	0,0012
9	Брис ока	5	2,5	>20	0,0008

МИК- минимална антимикробна концентрација

Као и код изолата *P. aeruginosa* и на изолате *Klebsiella* spp. уље ртањског чаја показало је највећу активност, праћено уљем босиљка док је уље жалфије било неактивно у овом случају. Добијени резултати антимикуробне активности за ова три уља су потпуно очекивани с обзиром на њихов хемијски састав. Показано је да највећу антимикуробну активност имају етарска уља која садрже алдехидне и фенолне компоненте попут цинамалдехида, карвакрола, еугенола или тимола, праћена уљима која садрже терпенске алкохоле попут линалола, док уља која садрже кетоне и естре попут β -мирцена, α -тујона и геранил ацетата у највећем проценту имају најнижу активност (Adrar et al., 2016). Неприметна активност уља жалфије на *Klebsiella* spp. тестиране изолате је очекивана јер ово уље садржи 29,7% α -тујона, који у односу на карвакрол (уље ртањског чаја) и линалол (уље босиљка) има најслабију антимикуробну активност.

Претходно истраживање у коме је тестирано етарско уље *Salvia officinalis* показало је да су се МИК концентрације кретале у опсегу од 173,7-178,9 $\mu\text{g/mL}$ на *K. oxytoca* и 207,4-240 $\mu\text{g/mL}$ на *K. pneumoniae* клиничке изолате (Fournomiti et al., 2015). Са друге стране, истраживање Hammer и сарадника (1999) показује да је уље жалфије било активно при концентрацији од 20 mg/ml (2%) на референтни сој *K. pneumoniae* NCTC 11228. МИК концентрација од 14,995 mg/ml на сој *K. pneumoniae* 1603 уочена је у истраживању Adrar и сарадника (2016). Међутим хемијски састав тестираног уља у овим истраживањима (Hammer et al., 1999; Fournomiti et al., 2015; Adrar et al., 2016) није испитан те није адекватно поредити резултате са комерцијалним етарским уљем жалфије. Уља жалфије добијена 2019, 2020 и 2021 године са високим процентом камфора (42,8; 49,6; 42,49), α -тујона (19,8; 13,4, 13,9) и 1,8-синеола (13,7; 12,3; 20,5) показала су активност на изолате *K. oxytoca* (МИК 56,81; 56,81; 14,2 $\mu\text{l/ml}$) и изолате *K. pneumoniae* (МИК 56,81; 56,81; 28,40 $\mu\text{l/ml}$) (Аџимовић et al., 2022). Са друге стране, једно истраживање показало је да је етарско уље жалфије са већим процентом 1,8-синеола (14,8%) у односу на уље тестирано у овом истраживању (9,1%) испољило активност на сој *K. oxytoca* IBKle-101 при МИК концентрацији од 0,1 mg/ml (Delamare et al., 2007). Осим мањег процента заступљености 1,8-синеола, за који се зна да поседује антимикуробно дејство, слабија активности овде испитаног етарског уља уочава се и због чињеница да је тестирано на клиничке изолате који поседују већи степен резистенције и вирулентности у односу на референтне сојеве.

Hammer и сарадници (1999) су у свом истраживању окарактерисали уље босиљка као уље са слабијим ефектом на сој *K. pneumoniae* NCTC 11228 јер је остварило

активност при највишој тестираној концентрацији од 20 mg/ml (2%). Међутим хемијски састав уља у овом истраживању (Hammer et al., 1999) није испитан па је немогуће упоредити резултате са резултатима добијеним за овде тестирано уље босиљка. Друго истраживање етарског уља босиљка тестираног на 7 клиничких изолата *K. pneumoniae* различитог порекла показала је активност уља при концентрацијама 15-30 mg/ml (1,5-3% v/v). Доминантна компонента тестираног уља је била метил чавикола (Sakkas et al., 2016). Ђорђевић и сарадници (2022) испитивали су ефекат три уља босиљка EO1 (линалол 30,3%; метил чавикол 24,2%; 1,8-синеол 4%), EO2 (линалол 51,2%; ери- α -кадинол 7,3; 1,8-синеол 6,6%) и EO3 (линалол 58,2%; ери- α -кадинол 7,5%; 1,8-синеол 4,2%) добијених различитим методама изолације на сој *K. pneumoniae* ATCC 700603 и показали су минималне инхибиторне концентрације за сва три уља износиле 12,93 mg/ml. Етарска уља добијена из листова *O. basilicum* са линалолом (61,7%) и 1,8-синеолом (17,2%) као доминантним компонентама и плодова (62,9% линалола и 18,7% 1,8-синеола) показала су активност уља на сој *K. pneumoniae* при концентрацијама од 5 mg/ml и 10 mg/ml (Usman et al., 2013). Етарско уље тестирано у овом истраживању чија је доминантна компонента такође линалол, било је активно при нешто нижим концентрацијама (2,5-10 mg/ml). Показано је да еугенол, једна од доминантних компоненти овде тестираног комерцијалног уља босиљка (5,8%), инхибира карбопенем резистентне *K. pneumoniae* сојеве при концентрацији од 0,2 mg/ml. Еугенол је оштетио ћелијску мембрану, смањио концентрацију АТФ-а у ћелији, смањио рН и хиперполаризацију мембране (Qian et al., 2020). Све наведено такође објашњава бољу активност овде тестираног комерцијалног уља босиљка, с обзиром да је еугенол једна од доминантних компоненти која сигурно доприноси његовој већој антимицробној активности.

Претходно истраживање у коме је испитиван ефекат етарских уља *S. montana* добијених из биљног материјала са три различите локације показала је кретање МИК концентрација у опсегу од 6,25->50 μ l/ml за врсту *K. pneumoniae* и од 12,5-25,0 μ l/ml за врсту *K. oxytoca* (Mihajilov-Krstev et al., 2014). Maccelli и сарадници (2020) су у свом истраживању испитали ефекат различитих уља ртањског чаја и добили су МИК вредности од 1,56 mg/ml за CEO1 и CEO2 и 0,78 mg/ml за CEO3 (CEO1, CEO2 и CEO3 су уља добијена у лабораторији) и 0,39 mg/ml (комерцијално уље) при деловању на изолате *K. pneumoniae*. Уља добијена у лабораторији садржала су нижи проценат карвакрола (29%, 28,7% и 23,9%) и *p*-цимена (10,3%, 9,4% и 12,3%), али већи проценат γ -терпинена (12,3%, 14,7% и 15%) у односу на комерцијално уље које је садржало 43,9% карвакрола, 15,3% *p*-цимена и 4,5% γ -терпинена. Боља активност комерцијалног уља у

односу на уља добијена у лабораторији указује на чињеницу да већи проценат карвакрола и *p*-цимена доприноси бољем антимикуробном потенцијалу уља. Осим тога показано се да је *p*-цимен делује синергистички у комбинацији са карвакролом јер му својом активношћу омогућује бољи продор у бактеријску ћелију (Kon & Rai, 2012). У прилог овој чињеници иде и податак да је етарско уље СЕОЗ имало нижи проценат карвакрола (23,9%) у односу на остала два уља добијена у лабораторији али и виши проценат *p*-цимена (12,3%), који је довео до боље активности овог уља у односу на остала два (Masselli et al., 2020). Етарско уље ртањског чаја које је садржало карвакрол (55,01%); *p*-цимен (14,71%) и γ -терпинен (11,09%) показало је активност на изолат *K. oxytoca* при концентрацији од 3,125 mg/ml (Kovačević et al., 2021). Истраживање у ком је тестиран ефекат етарских уља добијених из биљака у различитим фазама онтогенезе, показала је да проценат карвакрола (52,4%, 26,2%, 16,1%) опада, а проценат *p*-цимена (3,8%, 15,2%, 25,6%) расте у узорцима уља добијених пре, током и након цветања биљке. Међутим сва три уља испољила су антимикуробно дејство на *K. pneumoniae* ATCC 10031 при концентрацији од 25 mg/ml (Skočibušić & Bezić, 2004). На ефикасност уља ртањског чаја утиче његов хемијски састав који може да варира у зависности од географског порекла, услова животне средине као и од фазе развића биљке. Утврђено да са порастом надморске висине значајно опада садржај тимола и карвакрола једињења (Mihajilov-Krstev et al., 2014), док фаза онтогенетског развића такође утиче на проценат заступљености компоненти са антимикуробним потенцијалом (Skočibušić & Bezić, 2004). Осим тога на хемијски састав уља ртањског утиче и метода екстракције уља из биљног материјала, па су тако Ђорђевић и сарадници (2021) показали да је уље добијено из свежег биљног материјала методом без растварача (доминантне компоненте *p*-цимен, лимонен, цис-сабинен хидрат и гермакрен D) остварило нижу антимикуробну активност на сој *K. pneumoniae* ATCC 700603 (МИК 5,82 mg/ml), односу на уља добијена из сувог биљног материјала методом микроталасне пећнице (карвакрол 18,3%, тимол 12,5 и линалол 10,6%; МИК 0,65 mg/ml) и методом хидродестилације (карвакрол 26,6% и тимол 16,7%; МИК 1,13 mg/ml). Комерцијално етарско уље тестирано у овом истраживању показало је активност при опсегу концентрација 1,5-5 mg/ml зависно од тестираног изолата, што се може сматрати бољом активношћу у односу на изнад наведене резултате с обзиром на чињеницу да је тестирано на клиничке изолате који су показали резистенцију на више од једног антибиотика. Доминантне компоненте овде анализираних уља су карвакрол (24,3%), тимол (15,5%) и *p*-цимен (12,2%), а за њима следе *O*-метил карвакрол (8,2%) и борнеол (6%).

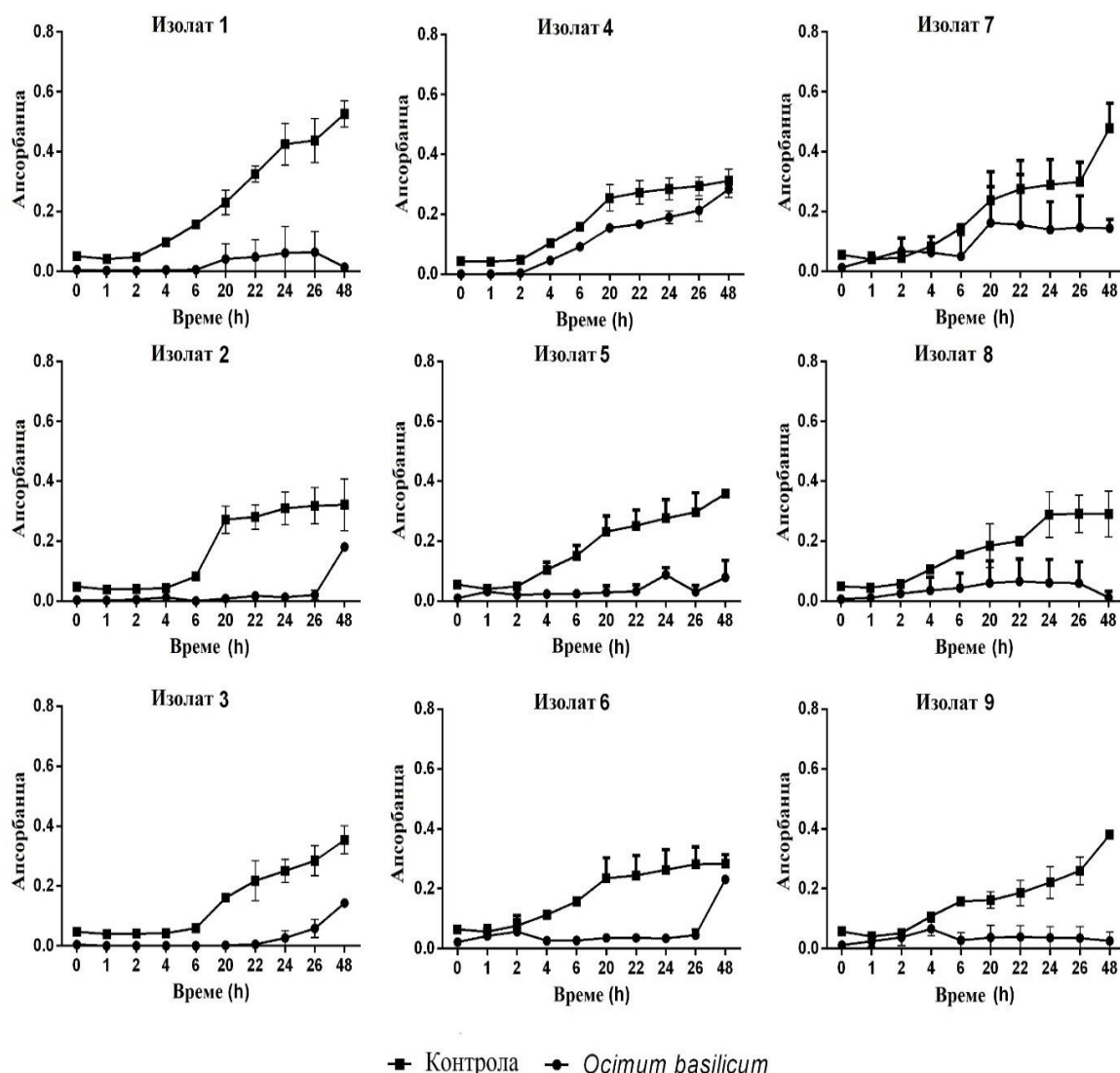
Разлог велике варијабилности резултата у различитим истраживањима за сва три наведена уља може да буде последица различитог процента и заступљеност појединих компоненти у уљу. Са друге стране, антимикуробна активност уља зависи и од генотипских и фенотипских карактеристика испитиваних сојева. Антимикуробна активност етарских уља је углавном последица оштећења ензимских система који су укључени у синтези структурних компоненти и производњи енергије, или промене пермеабилности ћелијске мембране. Са друге стране активност етарских уља може бити спречена капсулама коју врсте рода *Klebsiella* поседују. Капсуле блокирају пролазак етарских уља до унутрашње мембране и на тај начин смањују или потпуно инхибирају активност уља (Fournomiti et al., 2015).

С обзиром на веома слабу антимикуробну активност комерцијалног уља жалфије на клиничке изолате *Klebsiella* spp., односно веома високе концентрације при којима је показало активност, уље жалфије није испитивано у даљим тестовима.

4.14. Ефекат етарских уља на раст изолата *Klebsiella* spp.

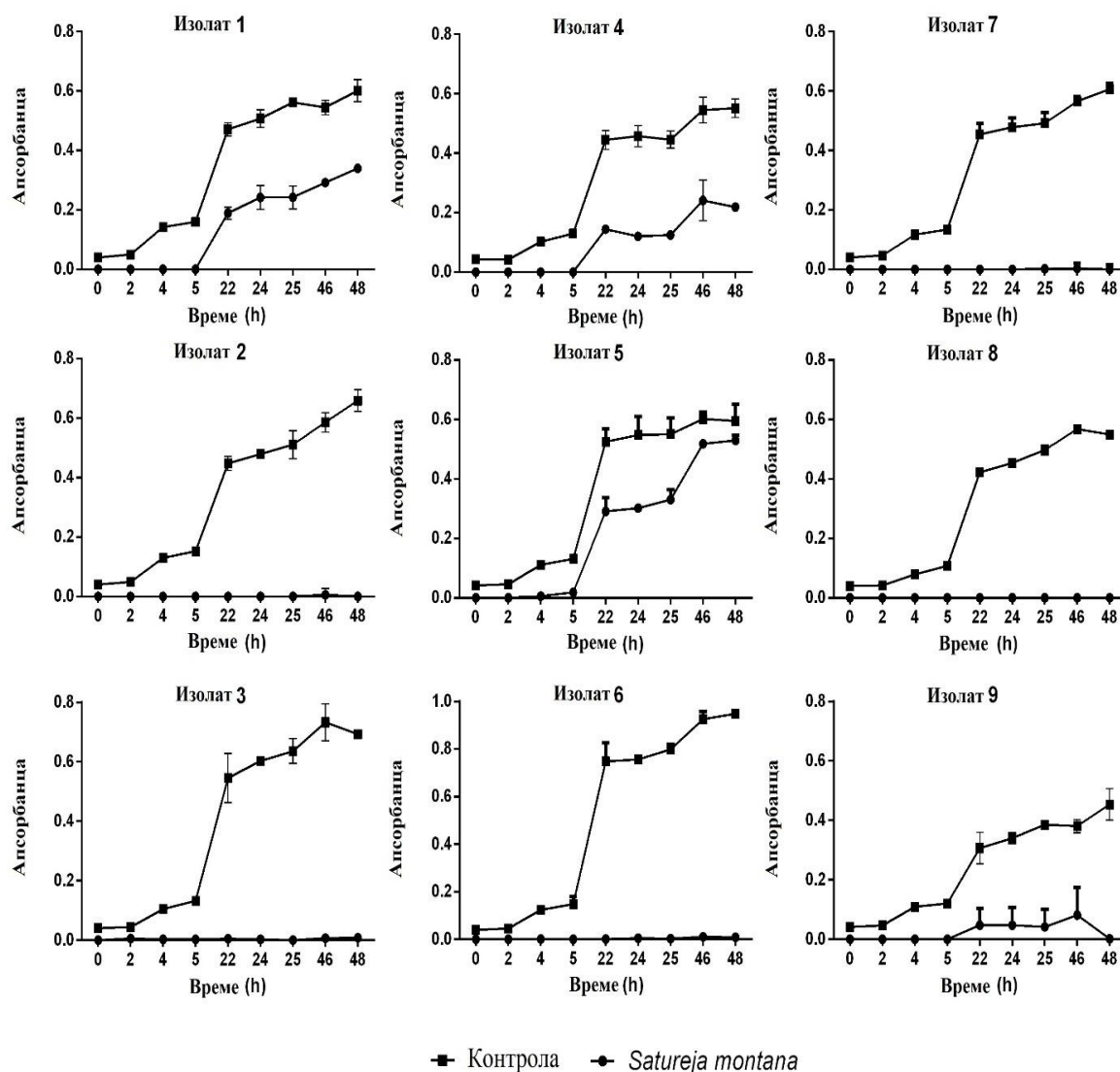
Како би испитали утицај етарских уља на раст изолата *Klebsiella* spp., сојеви су у присуству уља босиљка и ртањског чаја (МИК концентрације) гајени током 48 h. Апсорбанца је мерена у различитим временским интервалима, а затим су одређене криве раста за сваки сој појединачно.

Етарско уље босиљка инхибирало је раст бактерија током првих 26 h третмана, након чега је уочен опоравак код појединих изолата (Слика 22). Опоравак је примећен код изолата 2, 3, и 6, па је тако код наведених изолата на крају третмана (након 48 h) раст био инхибиран за 43,68%, 59,55% и 18,38% у односу на контролу. Са друге стране код изолата 1, 8 и 9 уље је у потпуности инхибирало раст ћелија. Знатно слабији ефекат уља остварен је код изолата 4, где је инхибиција раста примећена само у првих 6 сати третмана, након чега је дошло до скоро потпуног опоравка ћелија, па је тако на крају третмана раст овог изолата инхибиран за свега 9%.



Слика 22. Графички приказ кривих раста изолата *Klebsiella* spp. након третмана уљем *Ocimum basilicum* у МИК концентрацијама. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey pos-hoc тестом.

Након третмана уљем ртањског чаја уочено је да уље већ у првих пар сати у потпуности инхибира раст изолата 2, 3, 6, 7, 8 и 9, где чак и након 48 h није дошло до опоравка и поновног раста ћелија. Код изолата 1, 4 и 5 забележена је инхибиција само у првих 21 h третмана, након чега је дошло до поновног раста бактерија. У поређењу са контролом, након третмана уљем ртањског чаја у временском интервалу од 48 h код изолата 1 раст је инхибиран за 43,5%, код изолата 4 за 60,3% и код изолата 5 за 10% (Слика 23).



Слика 23. Графички приказ кривих раста изолата *Klebsiella* spp. након третмана уљем *Satureja montana* у МИК концентрацијама. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су Two Way ANOVA тестом праћеним Tukey post-hoc тестом.

Након укупног периода инкубације, LD₅₀ (редукција преко 50% укупне величине популације) постигнута је код 67% тестираних изолатата након третмана уљем босиљка и 78% након третмана уљем ртањског чаја. Уље ртањског чаја показало је и бољи бактерицидни ефекат у потпуности инхибирајући раст код 6 од 9 изолатата, док је уље босиљка исти ефекат показало само код 3 изолатата.

Када упоредимо ефекат који је уље босиљка остварило у овом истраживању делујући на изолате *Klebsiella* spp., (67%) у односу на изолате *P. aeruginosa* (57%), уочавамо да је нешто бољи ефекат уље испољило на изолате *Klebsiella* spp. Са друге стране уље ртањског чаја показало се нешто ефикаснијим инхибиторним агенсом у

третману изолата *P. aeruginosa* (86%) у односу на изолате *Klebsiella* spp. (78%). Међутим знатно бољи бактерицидни ефекат уље ртањског чаја испољило је у третману изолата *Klebsiella* spp. (67%) у односу на изолате *P. aeruginosa* (14%).

Досадашња истраживања које су испитивале утицај етарског уља босиљка на сојева *K. pneumoniae* (Hammer et al., 1999; Usman et al., 2013; Sakkas et al., 2016) нису тестирала ефекат овог уља на раст *K. pneumoniae* током дужег временског интервала, те је немогуће поредити са овде тестираним комерцијалним етарским уљем босиљка. Истраживање у коме је испитиван утицај еугенола на раст карбопенем резистентних изолата *K. pneumoniae* (Qian et al., 2020), показала је да еугенол при МИК концентрацијама значајно смањује, али не инхибира у потпуности раст изолата током 24 h. Са друге стране, присуство еугенола при 2МИК концентрацијама након 8 h третмана потпуно инхибира раст бактерија. Наведена активност еугенола објашњава показану активност овде тестираног етарског уља босиљка (еугенол једна од главних компоненти), а које је инхибирало раст бактерија у првих 26 h третмана.

Истраживања која су тестирале утицај етарског уља ртањског чаја на сојева *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* (Skočibušić & Bezić, 2004; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Maccelli et al., 2020; Đorđević et al., 2021) нису испитивале ефекат на раст бактерија током дужег временског интервала, те нема могућности за поређење са резултатима добијеним у овом истраживању. Када су у питању појединачне компоненте уља, утврђено је да је карвакрол при МИК концентрацијама од 130 mg/l и 260 mg/l деловао након 4 h третмана и инхибирао раст мултитезистентних изолата *K. pneumoniae*. Карвакрол утиче на вијабилност ћелија реметећи структуру и функцију ћелијске мембране тако што се уграђује између ланаца масних киселина у фосфолипидном двослоју (de Souza et al., 2021). Такође уља богата карвакролом попут *Origanum marjorana* у потпуности су инхибирала све бактеријске ћелије *K. pneumoniae* у року од 6 h при МИК концентрацијама (El-Tablawy & Araby, 2017). Наведене чињенице указују да је карвакрол једна од компоненти која доприноси активности уља ртањског чаја, а у овде тестираном уљу представља доминанту компоненту (24,3%). Уз карвакрол, висок проценат *p*-цимена (12,2%) такође значајно доприноси активности карвакрола и самим тим уља.

4.15. Продукција биофилма изолата *Klebsiella* spp.

Изолати *Klebsiella* spp. тестирани су на продукцију биофилма и класификовани према критеријумима Stepanovića и сарадника (2007). Укупно 9 изолата различитог порекла, узорак урина (7 изолата), брис ране (1 изолат) и брис ока (1 изолат) окарактерисани су као јаки, умерени и слаби продуценти биофилма зависно од начина култивације. Од наведених изолата, 3 су окарактерисана као сензитивни јер су били осетљиви на више од пет тестираних антибиотика, док су осталих 6 изолата окарактерисани као мултирезистентни. Табела 17 приказује продукцију биофилма при различитим начинима култивације и резистенцију изолата.

Табела 17. Продукција биофилма и резистенција изолата *Klebsiella* spp.

Изолати	Порекло узорака	Продукција биофилма пре адхезије*	Продукција биофилма након адхезије**	Зрео биофилм ***	Резистенција
Бр. 1	Узорак урина	Јак продуцент	Слаб	Јак	С
Бр. 2	Узорак урина	Умерен продуцент	Слаб	Умерен	С
Бр. 3	Узорак урина	Јак продуцент	Слаб	Јак	С
Бр. 4	Узорак урина	Јак продуцент	Слаб	Јак	Р
Бр. 5	Узорак урина	Јак продуцент	Умерен	Јак	Р
Бр. 6	Узорак урина	Јак продуцент	Слаб	Јак	Р
Бр. 7	Узорак урина	Јак продуцент	Умерен	Јак	Р
Бр. 8	Брис ране	Умерен продуцент	Умерен	Јак	Р
Бр. 9	Брис ока	Умерен продуцент	Умерен	Јак	Р

С - осетљивост на пет или више тестираних антибиотика

Р - резистенција на један или више тестираних антибиотика

*Продукција биофилма током инкубационог периода од 24 h без замене медијума.

** Продукција биофилма када се уклоне планктонске ћелије након 2 h иницијалног периода адхезије и након додавања свежег медијума.

*** Продукција биофилма када се ћелије инкубирају 24 h након чега се медијум замени свежим и инкубирају још додатних 24 h

Међу тестираним изолатима *Klebsiella* spp. уочљива је чињеница да бактерије продукују мање биофилма када се бујон замени свежим након фазе адхезије, односно када се уклоне планктонске ћелије, као и код изолата *P. aeruginosa*. Изолати који су окарактерисани као јаки и умерени продуценти биофилма када су инкубирани без замене подлоге током 24 h, показали су значајно нижу продукцију биофилма (слаби и

умерени) када је бујон након 2 h инкубације (фазе адхезије) замењен свежим. Са друге стране, када су ћелије инкубирани 24 h, а онда након тога бујон замењен новим бујоном и инкубирани још 24 h, код свих изолата уочена је већа продукција биофилма. Нижи проценат продукције биофилма је највероватније последица уклањања планктонских ћелија након фазе адхезије, које дефинитивно имају важну улогу у формирању биофилма и QS комуникацији. У трећем случају инкубације где је до замене подлоге дошло након формирања биофилма током 24 h, продужена инкубација ћелија (додатних 24 h) доводи до веће продукције и формирања зрелог биофилма.

На основу наведених резултата може се закључити да је већина биофилм продукујућих изолата (6 од 9) показала резистенцију на већи број антибиотика. Сличне резултате добили су у свом истраживању Nirwati и сарадници (2019), где је од 148 (85,63%) изолата *K. pneumoniae* који су продуковали биофилм (45 изолата јаки, 48 умерени и 50 слаби продуценти) 54,49% окарактерисано као мултирезистентно. Овакви резултати су очекивани с обзиром на познату чињеницу да биофилм успорава продирање и деактивира антибиотике, али и захваљујући комуникацији ћелија у биофилму мења се одговор ћелија које су позициониране у његовим дубљим слојевима (Stewart & Costerton, 2001). Продукт гена *AmpR* врши регулацију гена *DHA-1*, који се налази на плазмиду, а који је одговоран за резистенцију на цефалоспорине. Овај ген такође утиче на формирање биофилма и експресију гена за фимбрије типа 3 код *Klebsiella* spp. (Vuotto et al., 2014).

Са друге стране, Серас и сарадници (2019) нису уочили директну везу између процента продукције биофилма и мултирезистенције Грам негативних изолата. Мултирезистентни сојеви не морају нужно да имају већу продукцију биофилма у односу на сојеве који нису мултирезистентни. Ову чињеницу потврђују изолати 8 и 9 који су показали умерену продукцију биофилма након 24 h и мултирезистенцију, док су изолати 1 (јак продуцент) и 2 (умерен продуцент) били сензитивни на више од 5 тестираних антибиотика.

4.16. Ефекат етарских уља на продукцију биофилма изолата *Klebsiella* spp.

4.16.1. Формирање биофилма у фази пре адхезије (Pre-adhesion biofilm formation)

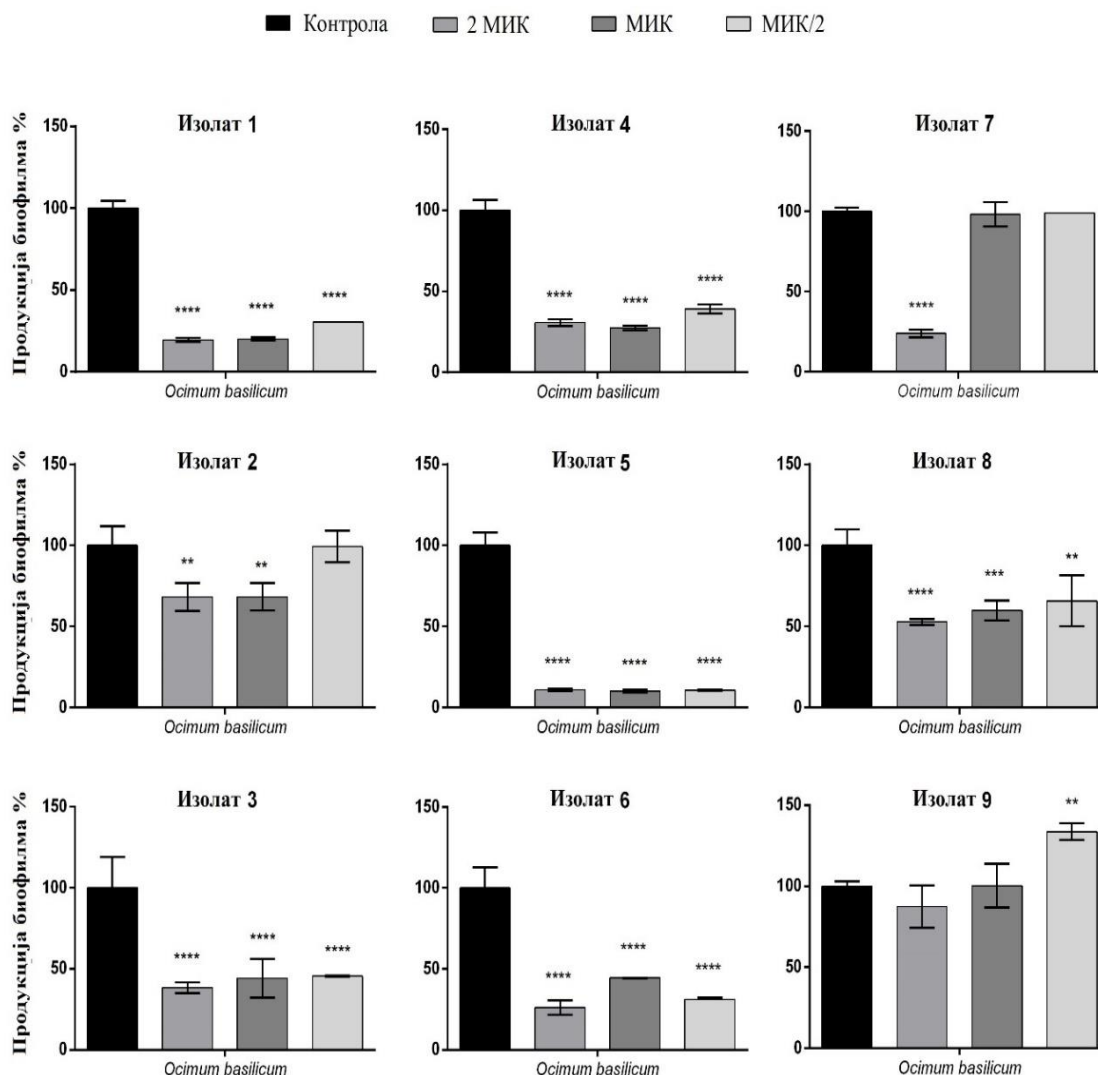
Након одређивања способности изолата *Klebsiella* spp. да продукују биофилм при различитим методама и периодима култивације, испитан је ефекат етарских уља босиљка и ртањског чаја на продукцију (фаза пре адхезије ћелија и фаза након адхезије ћелија), али и разлагање већ формираног биофилма код наведених изолата.

Како би се одредио ефекат етарских уља на продукцију биофилма, ћелијским суспензијама су додата уља у МИК/2, МИК и 2хМИК у самом старту култивационог периода (0 h) и тако припремљене суспензије су инкубирани на температури од 37 °C током 24 h. Резултати утицаја уља босиљка и ртањског чаја приказани су на Сликама 24 и 25.

Када је уље босиљка примењено у фази пре адхезије ћелија, показало је инхибицију продукције биофилма у распону од 31,8-89,2% при 2хМИК, 31,6-89,9% при МИК концентрацијама, док је МИК/2 инхибирала продукцију биофилма у опсегу 34,2-89,2% (Слика 24). МИК концентрација није испољила активност на изолате 7 и 9, док уље при МИК/2 концентрацијама није деловало на изолате 2, 7 и 9. Највећа инхибиција при свим тестираним концентрацијама постигнута је на изолат 5 (89,2%, 89,9% и 89,2%), док је изолат 9 (при свим тестираним концентрацијама) показао резистенцију на уље босиљка.

Етарско уље ртањског чаја при 2хМИК инхибирало је продукцију биофилма код свих тестираних изолата (опсег инхибиције 23,4-72,2%), док је под утицајем МИК опсег инхибиције износио 34,2-70%. Најнижи проценат редукције 14,8-63,13% уочен је након примене МИК/2, а изолати 1, 3, 4, 5, 6, и 9 показали су резистенцију на ове концентрације (Слика 25). Највећи проценат редукције биофилма при свим тестираним концентрацијама уочен је код изолата 7 (61,2%, 66,3% и 63,1), а најнижи код изолата 8.

Са друге стране, након примене уља код неких од изолата уочена је промоција продукције биофилма уместо инхибиције. Примена уља босиљка у МИК/2 концентрацији довела је до промоције продукције биофилма код изолата 9, док је након примене уља ртањског чаја промовишући ефекат уочен код изолата 1, 4 и 6 при МИК/2 и изолата 4 при МИК концентрацији.

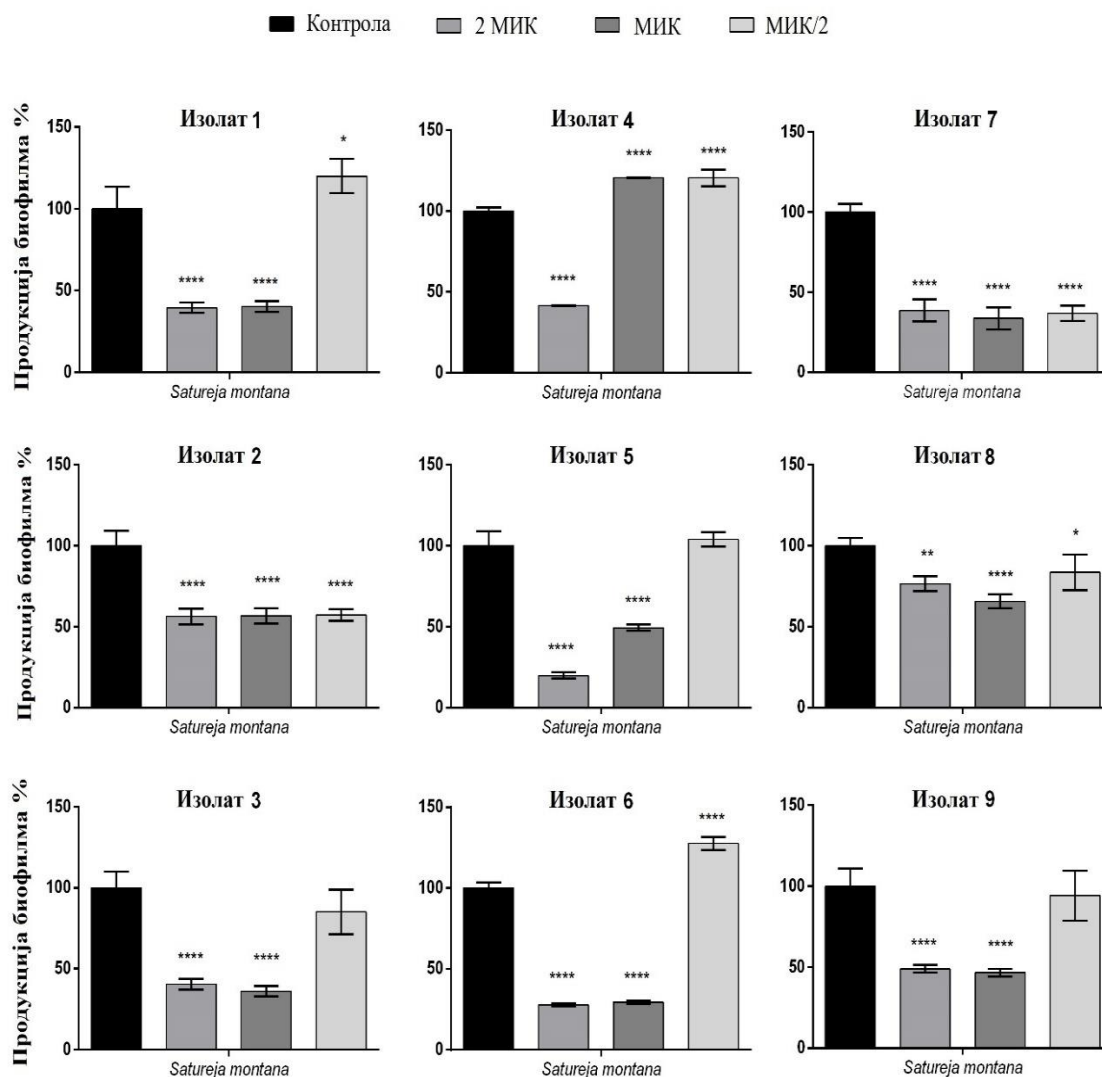


Слика 24. Продукција биофилма изолата *Klebsiella* spp. након третмана уљем *Ocimum basilicum* на почетку инкубационог периода- фаза пре адхезије ћелија. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Концентрациона зависност тестираних уља на продукцију биофилма изолата *Klebsiella* spp. није уочена, али је уочљива чињеница да су МИК/2 концентрације оствариле најнижи ефекат инхибиције биофилма.

Изолати 1, 2 и 3 који су били осетљиви антибиотике, показали су осетљивост на оба уља као што је и очекивано. Међутим, са друге стране изолати 5, 6 и 8 који су такође показали осетљивост на оба уља, показали су високу резистенцију на антибиотике. Ови резултати показали су да се осетљивост на антибиотике не може увек повезати са осетљивошћу на уља. Разлог томе је највероватније различит механизам активности уља и антибиотика.

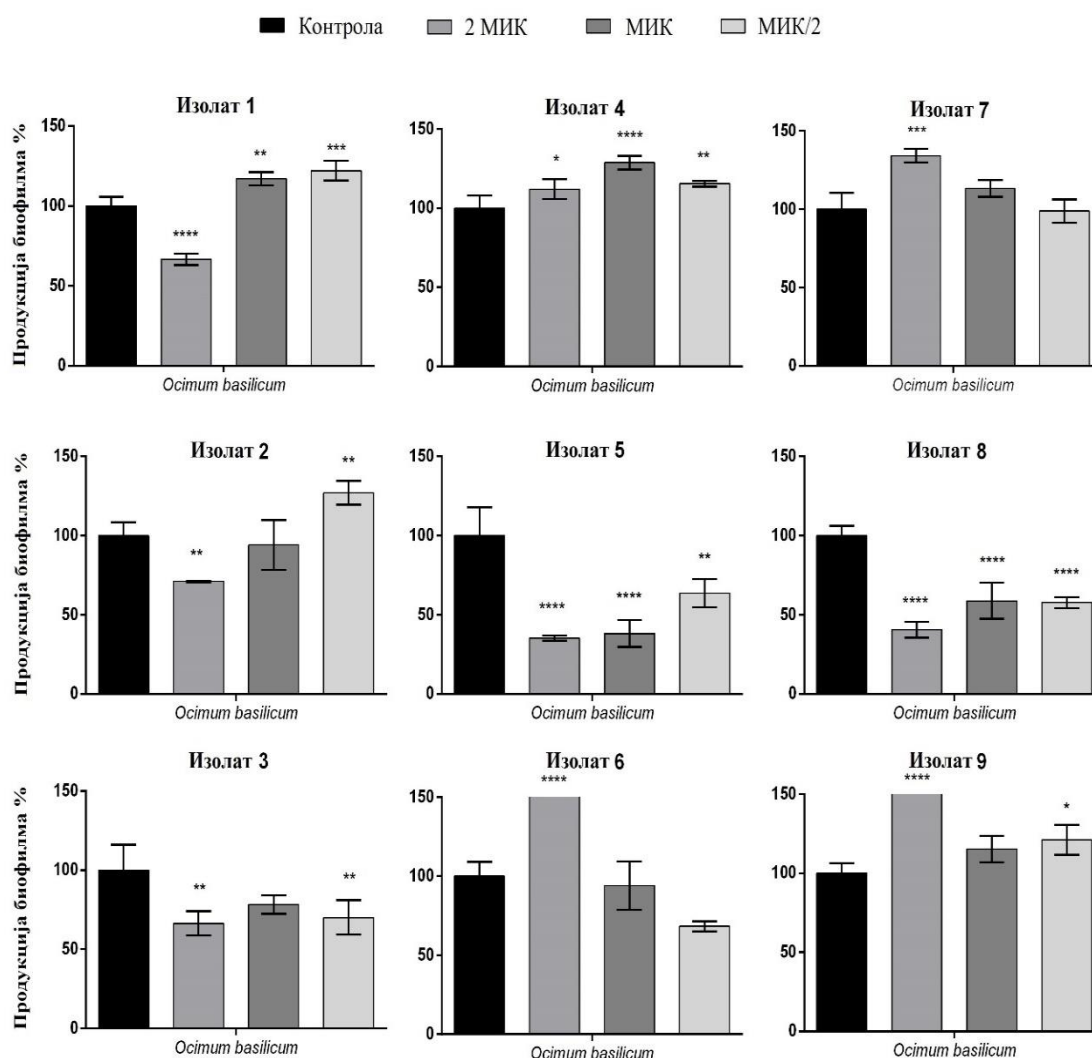
На основу приказаних резултата може се закључити да је етарско уље босиљка показало бољи редукциони ефекат, са процентом инхибиције до 89,9% у односу на уље ртањског чаја (72,2%). Најслабији ефекат на продукцију биофилма показале су МИК/2 концентрације уља.



Слика 25. Продукција биофилма изолата *Klebsiella* spp. након третмана уљем *Satureja montana* на почетку инкубационог периода- фаза пре адхезије ћелија. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

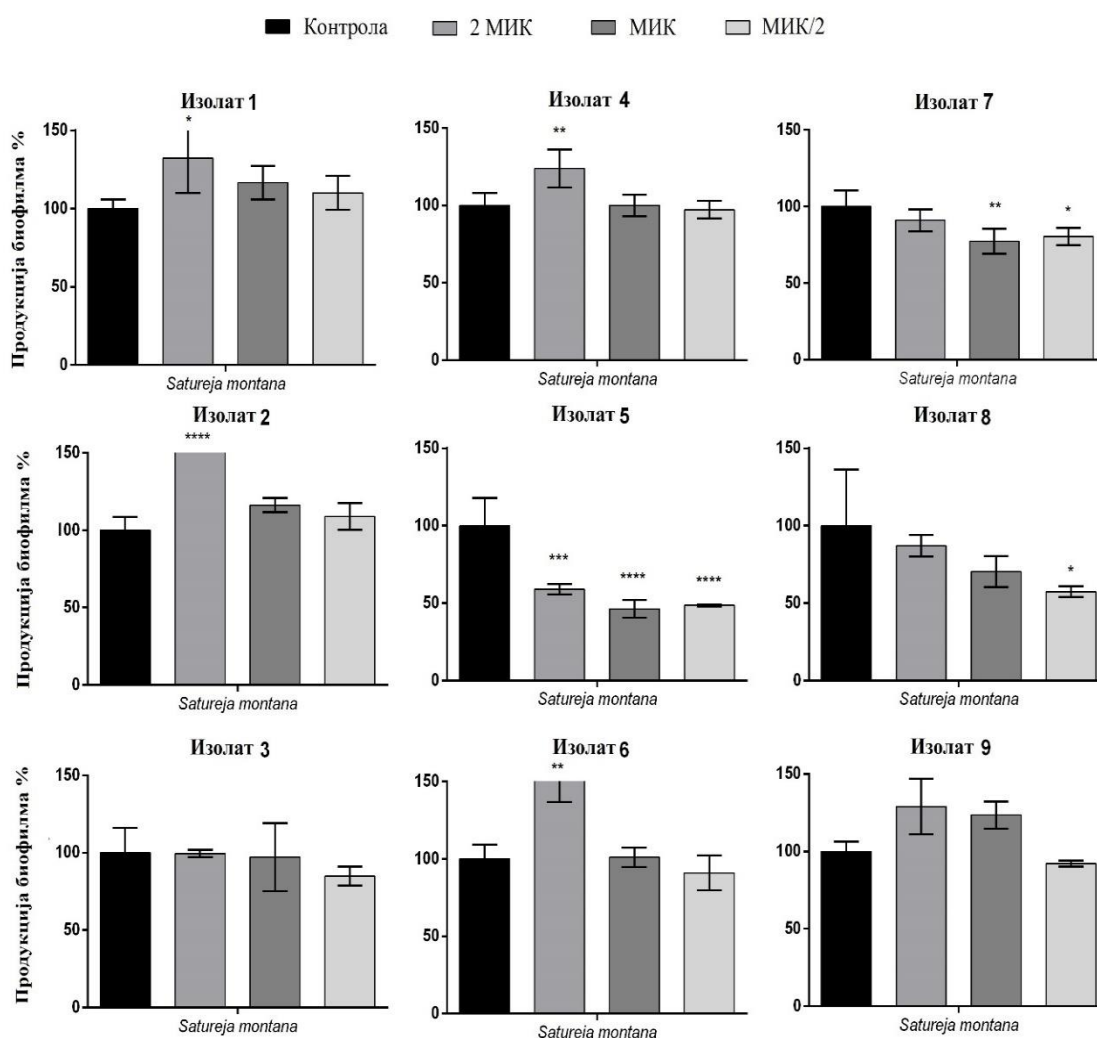
4.16.2. Ефекат етарских уља на продукцију биофилма након фазе адхезије изолата *Klebsiella* spp. (Post-adhesion biofilm formation)

Како би се одредио ефекат уља на иницијални адхерирани слој ћелија, уља су додата након 2 h инкубације уз истовремено уклањање планктонских ћелија. Примена уља босиљка при највећим концентрацијама инхибирала је продукцију биофилма код изолата 1, 2, 3, 5 и 8, а проценат инхибиције кретао се у опсегу 28,8-64,7% (Слике 26). Примена уља у МИК концентрацији довела је до инхибиције биофилма код изолата 5 (61,7%) и изолата 8 (41,7%), док је МИК/2 концентрација редуковала биофилм изолата 3, 5 и 8 за 29,9%, 36,2% и 42,2%.



Слика 26. Продукција биофилма изолата *Klebsiella* spp., изражена у процентима, у присуству уља *Ocimum basilicum* након фазе адхезије ћелија у односу на контролне узорке. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Резултатати добијени након примене уља ртањског чаја на адхериране ћелије, указују да је ово уље показало веома слабу инхибицију биофилма. Статистички значајна редукција биофилма након апликације 2xМИК концентрације уља ртањског чаја уочена је само код изолата 5 (40,98%). Присуство уља у МИК концентрацији редуковало је биофилм само код изолата 5, 7 и 8, где је проценат редукције износио 53,7%, 22,5% и 29,6%. Сличан ефекат уочен је при МИК/2 концентрацијама, где је уље смањило продукцију биофилма изолата 5 за 51,3%; изолата 7 за 19,5% и изолата 8 за 42,5% (Слика 27). Највећи ефекат на смањење продукције биофилма уочен је код изолата 5, док код изолата 3 није уочена никаква промена у продукцији биофилма након додавања уља ртањског чаја.



Слика 27. Продукција биофилма изолата *Klebsiella* spp., изражена у процентима, у присуству уља *Satureja montana* након фазе адхезије ћелија у односу на контролне узорке. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом ***** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Резултати указују да је примена уља након фазе адхезије смањила продукцију биофилма адхерираних ћелија појединих изолата, али је проценат редукције биофилма значајно нижи у односу на редукцију добијену применом уља пре адхезије ћелија.

Са друге стране, након примене оба уља код неких од изолата уочена је промоција продукције биофилма уместо инхибиције. Примена уља босиљка на већ адхерираних ћелија изолата 1, 2, 4, 6, 7 и 9 довела је до промоције продукције биофилма, док је уље ртањског чаја довело исти ефекат показало код изолата 1, 2, 4, 6 и 9, али само при 2xМИК концентрацијама.

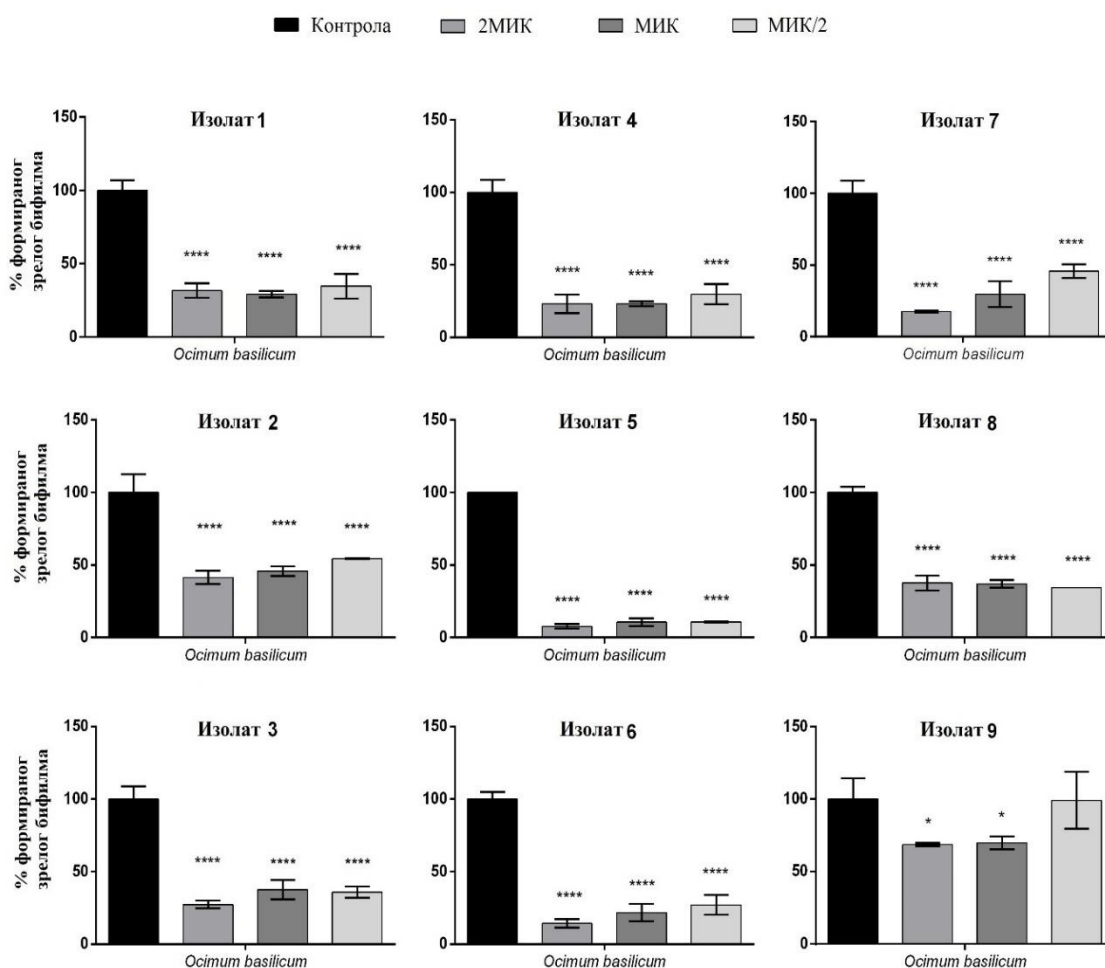
Када упоредимо промовишући ефекат биофилма који су уља остварила можемо закључити да су оба уља промовисала продукцију биофилма код већег броја изолата када су додавана након фазе адхезије у односу на то кад су додавана у самом старту инкубације (односно пре адхезије ћелија). Уље босиљка додато у самом старту инкубације промовисало је биофилм изолата 9, док је уље ртањског чаја промовишући ефекат показало на изолате 1, 5 и 6. Такође, може се уочити да су највише концентрације имале најинтензивнији промотивни ефекат.

Промотивни ефекат тестирана уља показала су и на продукцију биофилма изолата *P. aeruginosa* што је већ приказано у овом истраживању. Као што је већ наведено у делу који се односи на продукцију биофилма изолата *P. aeruginosa*, механизам који доводи до овог ефекта није познат, али се зна да уклањање подлоге и планктонских ћелија након два сата доводи до редукције концентрације сигналних молекула (QS молекула). Исти ефекат изазван различитим биљним метаболитима уочен је и у ранијим истраживањима (Leonard et al., 2010; Sandasi et al., 2011; Zodrow et al., 2012). Компоненте етарских уља R-(-)-карвон, еугенол (Leonard et al., 2010), али и α -пинен, 1,8-синеол, лимонен, линалол и геранил ацетат (Sandasi et al., 2008) такође доводе до повећања продукције биофилма код соја *L. monocytogenes*, док 1,8-синеол има промотивни ефекат и на продукцију биофилма соја *S. aureus* 6538P (Papa et al., 2020).

4.16.3. Ефекат етарских уља на деградацију зрелог биофилма изолата *Klebsiella* spp.

Како би одредили утицај уља на деградацију већ формираног зрелог биофилма, након инкубације на температури од 37 °C током 24 h, замењена је подлога и додата су уља у 2xМИК, МИК и МИК/2 концентрацијама и формирано биофилмови инкубирани додатних 24 h. Резултати су приказани на Сликама 28 и 29.

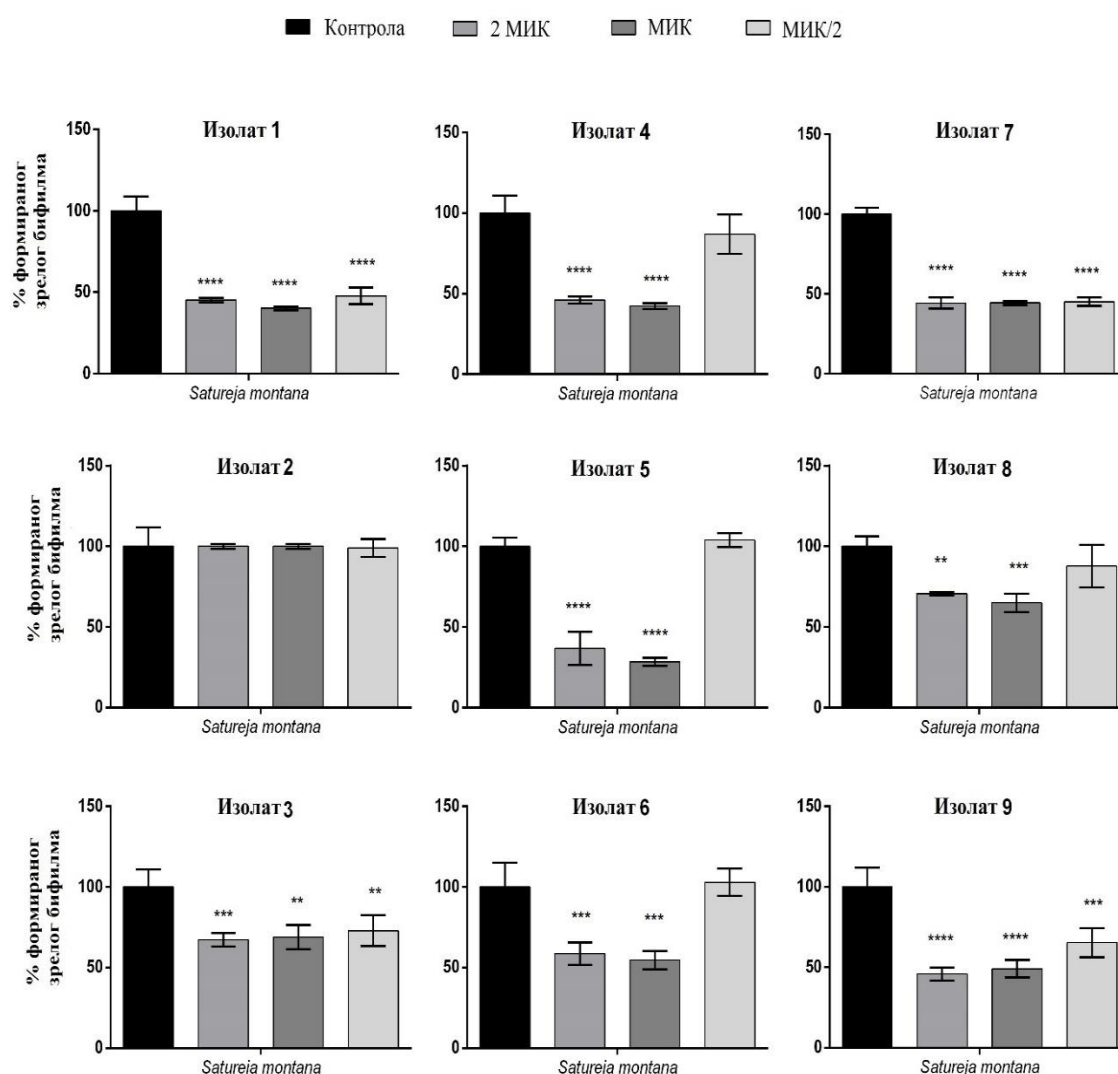
Након третмана уљем босиљка у 2xМИК концентрацијама, уочени проценат деградације биофилма кретао се у опсегу 32,4-92,3%, док су МИК концентрације деградовале зрео биофилм у опсегу 30,2-93,2%. Присуство уља при МИК/2 деградовало је биофилм до 89,5%. Највећи проценат деградације уочен је код изолата 5 (89,5%-93,2), док је најнижи ефекат уље испољило на изолат 9 (1-31,4%) (Слика 28).



Слика 28. Продукција зрелог биофилма изолата *Klebsiella* spp. након третмана комерцијалним етарским уљем *Ocimum basilicum*. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и нализирани One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

Етарско уље ртањског чаја деградовало је биофилмове у распону од 29,2% до 63,3% при 2xМИК концентрацији. МИК концентрација је показала опсег деградације у распону од 31,1-71,5%, а при МИК/2 концентрацији тај опсег је износио 12,2-62,4% (Слика 29). Највећи проценат деградације уочен је код изолата 5 (62,4-71,5%), док са друге стране уље није показало ефекат на биофилм изолата 2.

Као и на продукцију, етарско уље босиљка је показало бољи деградирајући ефекат и на зреле биофилмове у поређењу са уљем ртањског чаја. Концентрациона зависност на деградацију биофилма није уочена.



Слика 29. Продукција зрелог биофилма изолата *Klebsiella* spp. након третмана комерцијалним етарским уљем *Satureja montana*. Резултати су приказани као средње вредности \pm SD и анализирани су One way ANOVA тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ * $p < 0,05$ у односу на контролу.

а основу приказаних резултата може се закључити да су се оба тестирана уља показала као добра редукциона средства у третману продукције биофилма када су примењена у фази пре адхезије ћелија, али и у деградацији зрелог биофилма, док је примена уља након 2 h (на адхериране ћелије) показала знатно слабији ефекат.

До сада није испитан ефекат уља босиљка на продукцију и деградацију биофилма изолата *Klebsiella* spp. па самим тим нема података за поређење са резултатима добијеним за комерцијално уље босиљка. Са друге стране показано је да еугенол (компонента присутна у етарском уљу босиљка) инхибира формирање биофилма при МИК и 2xМИК концентрацијама карбопенем резистентног *K. pneumoniae* соја и смањује регулацију и експресију *pgaA*, *luxS*, *wbbM* и *wzm* гена одговорних за формирање биофилма (Qian et al., 2020). С обзиром на чињеницу да комерцијално етарско уље босиљка садржи еугенол (5,8%) као једну од доминантних компоненти, активност коју је уље показало на продукцију биофилма може се преписати овој компоненти. Утицај етарског уља босиљка на продукцију биофилма неких других сојева је позната и наведена у одељку који се односи на продукцију биофилма изолата *P. aeruginosa*.

Утицај уља ртањског чаја на продукцију и разлагање биофилма изолата *Klebsiella* spp. такође није испитан. Међутим резултати до којих су дошли Miladi и сарадници (2016) у свом истраживању показују да етарско уље *S. montana* инхибира стварање биофилмова код различитих сојева *Salmonella* spp., а најнижа концентрација при којој је инхибиција уочена кретала се између 0,6-6,45 mg/ml. У наведеном истраживању показано је да етарска уља имају утицај на метаболичку активност планктонских ћелија у биофилмовима. Са друге стране познато је да етарска уља која садрже сличне компоненте као уље ртањског чаја инхибирају продукцију биофилма сојева *Klebsiella* spp. Етарско уље мајчине душице које као главне компоненте садржи тимол и карвакрол, показало је значајну редукцију биофилма *K. pneumoniae* ATCC 700603 и изолата ове врсте (Iserri et al., 2020). Још једно истраживање у коме су тестирани етарско уље мајчине душице и тимол, показује да уље и тимол, самостално, али и у комбинацији са ципрофлоксацином смањују продукцију, али доводе и до разлагања већ формираног биофилма резистентних изолата *K. pneumoniae* (Mohamed et al., 2018). Утицај тимола али и карвакрола показан је и у истраживању Raei и сарадника (2017), где тимол при концентрацијама од 200-1600 µg/ml и карвакрол при концентрацијама од 125-500 µg/ml инхибирају продукцију биофилма резистентних изолата *K. pneumoniae* (NDM), *K. pneumoniae* (VIM-1), *K. pneumoniae* (OXA-48) и *K. pneumoniae* (KPC).

Познат је ефекат тимола и карвакрола и на формирање биофилма осталих патогена попут *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* и *E. coli*. Осим тога, тимол може блокирати стварање вијабилних филаментозних форми током раних фаза формирања биофилмова *C. albicans*. С обзиром да су биофилмови мултифакторијални догађаји, неколико различитих механизма дејства тимола могу утицати на различите фазе њиховог развоја (Memar et al., 2017).

4.17. Тип интеракције између антимикуробних агенаса код изолата *Klebsiella* spp.

Као што је већ било речи у делу о изолатима *P. aeruginosa*, превелика употреба антибиотика довела је до еволуције механизма резистенције код бактерија и развоја мултирезистенције, што представља један од водећих проблема данашњице. Због тога је потребно што пре наћи начине да се повећа активност постојећих антибиотика, а етарска уља су се због своје антимикуробне активности показала као потенцијални појачивачи антибиотика у третману мултирезистентних сојева.

Ефекат етарских уља босиљка и ртањског чаја на повећање ефикасности антибиотика ципрофлоксацина, као и тип интеракције између тестираних етарских уља на клиничке изолате *Klebsiella* spp. приказан је у Табели 18. Тестиране су комбинације босиљак/ципрофлоксацин (БЦ), ртањски чај/ципрофлоксацин (РЦ) и босиљак/ртањски чај (БР).

Након примене комбинације БЦ, синергистички ефекат уочен је код 66,66% тестираних изолата, док је адитивни ефекат уочен код два изолата (изолат 2 и 5). Нешто већу резистенцију на тестирану комбинцију показао је изолат 6 у поређењу са осталим изолатима, где је ФИКИ индекс показао индиферентни тип интеракције.

Са друге стране, комбинација РЦ показала је јачи ефекат у односу на БЦ комбинацију. Етарско уље ртањског чаја и ципрофлоксацин показали су синергистички ефекат код 77,77% тестираних изолата, а адитивни ефекат уочен је код изолата 4 и 5.

Након третмана ћелија комбинацијом уља босиљка и ртањског чаја (БР) синергистички ефекат уочен је код 44,4% изолата, док је иста комбинација остварила адитивни ефекат код 33,3% и индиферентни ефекат код једног изолата. Знатно већа вредност ФИКИ индекса уочена је код изолата 4, где су уља у комбинацији остварила антагонистичку интеракцију.

Табела 18. Тип интеракције између комерцијалних уља и антибиотика

Изолати	Уље босиљка/ципрофлорксацин (БЦ)		Уље ртањског чаја/ципрофлорксацин (РЦ)		Уље босиљка/ртањског чаја (БР)	
	ФИКИ	Тип интеракције	ФИКИ	Тип интеракције	ФИКИ	Тип интеракције
Изолат 1	0,06	С	0,28	С	0,5	С
Изолат 2	0,62	Ад	0,18	С	0,19	С
Изолат 3	0,09	С	0,31	С	0,62	Ад
Изолат 4	0,37	С	0,56	Ад	>2	А
Изолат 5	0,62	Ад	0,56	Ад	0,5	С
Изолат 6	1,03	И	0,37	С	0,503	Ад
Изолат 7	0,50	С	0,37	С	1,25	И
Изолат 8	0,19	С	0,25	С	0,503	Ад
Изолат 9	0,09	С	0,28	С	0,28	С

ФИКИ-индекс фракционе инхибиторне концентрације; С- синергистички ефекат $ФИКИ \leq 0,5$; Ад- адитивни ефекат $0,5 < ФИКИ \leq 1$; И- индиферентан ефекат $1 < ФИКИ \leq 2$; А- антагонистички ефекат $ФИКИ > 2$

Приказани резултати су обећавајући и указују на висок потенцијал уља босиљка и ртањског чаја као агенса који могу да повећају ефикасност ципрофлорксацина у терапији хроничних инфекција изазваних патогеним сојевима *Klebsiella* spp.

Као што је већ споменуто, неке компоненте етарских уља мењају осетљивост Грам негативних бактерија на лекове интерагујући са ефлукс пумпама па прекомерна активност ефлукс пумпи доводи до поновне осетљивости на одређени лек. Овај механизам деловања карактеристичан је за β -лактамске антибиотике и флуорохинолоне (где спада ципрофлорксацин) (Chouhan et al., 2017).

Резултати добијени у овом истраживању у сагласности су са резултатима које су добили Mahmoud и сарадници (2016), где је уље босиљка у комбинацији са ципрофлорксацином инхибирало 90,5% од укупно 21 тестираних изолата *K. pneumoniae*. Утицај уља ртањског чаја на активност ципрофлорксацина у третману изолата *Klebsiella* spp. до сада није испитан. Међутим, доказано је да етарска уља мајчине душице (*T. maroccanus* и *T. broussonetii*) богата карвакролом, показују синергистички ефекат у комбинацији са ципрофлорксацином при деловању на клинички изолат *K. pneumoniae* (Fadli et al., 2012). Са друге стране етарско уље *S. montana* у комбинацији са

гентамицином показује синергистички ефекат када је испитано на бактерије *E. coli* (Vitanza et al., 2019).

Истраживања која су испитивала утицај комбинација етарских уља или чистих компоненти етарских уља показале су варијабилне резултате. Faleiro и сарадници (2003) показали су антагонистички и синергистички ефекат чистих компоненти етарских уља у комбинацији, зависно од тестираног соја. Комбинација линалола и 1,8-цинеола резултовала је антагонистичким ефектом на сој *E. coli*, док је иста комбинација показала синергистички ефекат када је примењена на сој *C. albicans*. Сличне резултате добили су и Adrar и сарадници (2016), где је уље *S. officinalis* у комбинацији са уљем *Thymus numidicus* (богато линалолом (8,62–9,6%), слично комерцијалном уљу босиљка), остварило антагонистички ефекат када је примењено на сој *E. coli* 161.

Наведени резултати указују на чињеницу да комбинована терапија антибиотика и етарских уља или њихових компоненти које могу да на различите начине учине ћелију сензитивнијим на антибиотике, делује као перспективна стратегија за лечење инфекција изазваних сојевим *Klebsiella* spp.

5. ЗАКЉУЧАК

У овде представљеном истраживању анализирана су три етарска уља босиљка, жалфије и ртањског чаја, хемијски су окарактерисана и испитана је њихова антимикуробна и антивирулентна активност на изолате *P. aeruginosa* и изолате рода *Klebsiella* spp. Различитог порекла. Међу тестираним изолатима *P. aeruginosa*, 14 изолата показало је резистенцију на један и више антибиотика, док је 15 изолата је било осетљиво на све тестиране антибиотике. Са друге стране, сви тестирани изолати *Klebsiella* spp. показали су резистенцију на више од једног антибиотика, док је 6 изолата било резистентно на пет и више антибиотика и окарактерисани су као мултирезистентни. Сви тестирани изолати *P. aeruginosa* показали су се као јаки продуценти биофилма, док је међу изолатима *Klebsiella* било јаких, умерених, али и слабих продуцената биофилма.

Хемијска анализа комерцијалних уља показала је да уље жалфије припада типичном α -тујон/камфор хемотипу. Са друге стране, уље босиљка показало је нешто другачији састав, при чему је по високом проценту линалола слично европском хемотипу, али уз необично висок проценат (*E*)-анетол. Уље ртањског чаја као доминантне компоненте садржи камфор и тимол и *p*-цимен. Микродилуционом методом испитан је антимикуробни потенцијал уља, где су комерцијална уља босиљка и жалфије показала активност на изолате *Pseudomonas aeruginosa* у опсегу 5-20 mg/ml, док се опсег активности за уље ртањског чаја кретао од 0,63 до 10 mg/ml. Са друге стране, након примене поменутих уља на изолате *Klebsiella* spp. етарско уље босиљка показало је активност у опсегу 2,5-10 mg/ml, док је уље ртањског чаја било активно у опсегу од 1,25 до 5 mg/ml зависно од тестираног изолата. Концентрације уља жалфије кретале су се изнад 20 mg/ml, па се ово уље не може сматрати ефикасним у третману изолата *Klebsiella* spp. Након испитане антимикуробне активности етарских уља, испитан је и њихов ефекат на раст ћелија тестираних патогена у МИК концентрацијама током култивационог периода од 48 h, а резултати су приказани као криве раста. Сва три тестирана уља су испољила значајну редукуцију бројности укупне популације. Нешто већу активност током 48 h на изолате *P. aeruginosa* испољило је уље жалфије у односу на уља босиљка и ртањског чаја. Када је тестиран ефекат уља на раст изолата *Klebsiella* spp., уље ртањског чаја показало се ефикаснијим у односу на уље босиљка. Први пут је у овом истраживању испитана способност наведених комерцијалних етарских уља да редукују биофилм изолата *P. aeruginosa* и *Klebsiella* spp. у различитим фазама његовог

формирања. Резултати указују на редукујући потенцијал тестираних уља у свим испитиваним фазама развоја биофилма. Мања продукција биофилма свих тестираних сојева уочена је након уклањања планктонских ћелија, па је самим тим и нижа редукција уочена када су уља примењена на адхерирани монослој ћелија (пост адхезиони тест). Нижа продукција биофилма у пост адхезионом тесту је последица уклањања планктонских ћелија и сигналних молекула заједно са подлогом, што указује на њихов значај у QS комуникацији и формирању биофилма. Резултати тестова продукције биофилма указују да уља могу бити примењена у раним фазама формирања биофилма. Такође, тестирана уља скоро у потпуности разграђују формирани зрео биофилм код изолата *P. aeruginosa*, док је код изолата *Klebsiella* spp. тај ефекат нешто нижи, што указује на могућност примене уља у третману хроничних инфекција изазваних наведеним патогенима. Резултати тестова у којима је испитана активност уља на остале факторе вируленције соја *P. aeruginosa* показују да сва три уља значајно смањују продукцију пиоцијанина, док уља босиљка и жалфије показују и способност редукције покрета изолата *P. aeruginosa*, што није уочено након примене уља ртањског чаја. Тестирана уља довела су до повећања активности антибиотика ципрофлоксацина током комбиноване примене на наведене патогене клиничке изолате. Са друге стране, комбинација уља босиљка и ртањског чаја показала је могући антагонизам када се примени у третману изолата *Klebsiella* spp., па је због тога потребно урадити додатна истраживања на тему комбинације уља у примени на изолате наведених патогених сојева.

С обзиром да су уља босиљка, жалфије и ртањског чаја показала значајну антимикробну активност, али и ефекат у редукцији фактора вируленције, као и потенцијал у повећању активности антибиотика ципрофлоксацина, након додатних испитивања могу се сматрати добрим додатком у комбинованој терапији хроничних инфекција изазваних сојевима *Klebsiella* spp. и *P. aeruginosa*. Међутим треба нагласити да се антивирулентни, али и синергистички ефекат наведених уља са тестираним антибиотиком не може генерализовати јер је сој специфичан, односно код појединих сојева исте врсте уочено је одсуство наведених ефеката тестираних уља. Будућа истраживања би требало да открију тачан механизам деловања уља у смислу генске експресије, најефикаснији начин за њихову употребу у третману биофилмова, али и оптималну формулацију за њихову примену у форми комбиноване терапије са осталим антибиотцима.

6. ЛИТЕРАТУРА

- Abdul-Hussein, Z. R., & Atia, S. (2016). Antimicrobial effect of pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Experimental Biology*, 6(6:3), 4–7.
- Abdulhasan, G. A. (2015). The biological effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil on biofilm formation and some fimbrial Genes (fimH-1 and mrkD) of *Klebsiella pneumoniae*. *Iraqi Journal of Science*, 56(3), 2553–2560.
- Abdulhasan, G. A., Alzubaidy, S. K., & Abed, I. J. (2016). Effect of sub-inhibitory and inhibitory concentrations of some antibiotics and rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) on biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. *World Journal of Experimental Biosciences*, 4(August), 130–135.
- Aćimović, M., Pezo, L., Čabarkapa, I., Trudić, A., Stanković Jeremić, J., Varga, A., Lončar, B., Šovljanski, O., & Tešević, V. (2022). Variation of *Salvia officinalis* L. essential oil and hydrolate composition and their antimicrobial activity. *Processes*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/pr10081608>
- Aćimović, M., Šovljanski, O., Pezo, L., Travčić, V., Tomić, A., Zheljaskov, V. D., Četković, G., Švarc- Gajić, J., Brezo-Borjan, T., & Sofrenić, I. (2022). Variability in biological activities of *Satureja montana* Subsp. *montana* and Subsp. *variegata* based on different extraction methods. *Antibiotics*, 11(9), 1235. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics11091235>
- Aćimović, M., Todosijević, M., Varga, A., Kiproviski, B., Tešević, V., Čabarkapa, I., & Sikora, V. (2019). Bioactivity of essential oils from cultivated winter savory, sage and hyssop. *Lekovite Sirovine*, 39(39), 11–17. <https://doi.org/10.5937/leksir1939011a>
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy* (fourth). Allured Publishing Corporation. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083116584>
- Adonizio, A., Kong, K.-F., & Mathee, K. (2008). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), 198–203. <https://doi.org/10.1128/AAC.00612-07>
- Adrar, N., Oukil, N., & Bedjou, F. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.007>

- Aelenei, P., Miron, A., Trifan, A., Bujor, A., Gille, E., & Aprotosoiaie, A. (2016). Essential oils and their components as modulators of antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Medicines*, 3(3), 19. <https://doi.org/10.3390/medicines3030019>
- Agneswari, S., Nair, S. G., Kumari, S. K. V., & Queensly, C. C. (2023). Genetic variability of uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* in diabetic women. *A Journal for New Zealand Herpetology*, 12(4), 30–37.
- Ahmad, A., Viljoen, A. M., & Chenia, H. Y. (2015). The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology*, 60(1), 8–19. <https://doi.org/10.1111/lam.12343>
- Akthar, M., Degaga, B., & Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1), 1–7.
- Al-Kinani, R. M. H., & Al-Kaabi, S. J. (2019). Effect of camphor in biofilm formation of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus lentus*. *Biochemical and Cellular Archives*, 19(1), 291–294.
- Alhazmi, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and pathogenic mechanisms. *International Journal of Biology*, 7(2), 44–67. <https://doi.org/10.5539/ijb.v7n2p44>
- Alibi, S., Ben Selma, W., Ramos-Vivas, J., Smach, M. A., Touati, R., Boukadida, J., Navas, J., & Ben Mansour, H. (2020). Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*, 68(2), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.01.001>
- Alipour, M., Suntres, Z. E., & Omri, A. (2009). Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 317–325. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp165>
- Alotaibi, G. F., & Bukhari, M. A. (2021). Factors influencing bacterial biofilm formation and development. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 12(6), 617–626. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2021.12.001820>
- Alshammari, H. O., Somily, A., Yahia Qattan, M., Alsubki, R. A., & Moussa, I. M. (2023). Susceptibility pattern of multi-drug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolates from tertiary care hospital in Riyadh, KSA. *Journal of King Saud University - Science*, 35(5), 102702. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102702>
- Althunibat, O. Y., Qaralleh, H., Al-Dalin, S. Y. A., Abboud, M., Khleifat, K., Majali, I. S.,

- Aldal'In, H. K. H., Rayyan, W. A., & Jaafraa, A. (2016). Effect of thymol and carvacrol, the major components of *Thymus capitatus* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *10*(1), 367–374.
- Alves, S., Duarte, A., Sousa, S., & Domingues, F. C. (2016). Study of the major essential oil compounds of *Coriandrum sativum* against *Acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing. *Biofouling*, *32*(2), 155–165. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1133810>
- Alviano, W. S., Mendonça-Filho, R. R., Alviano, D. S., Bizzo, H. R., Souto-Padrón, T., Rodrigues, M. L., Bolognese, A. M., Alviano, C. S., & Souza, M. M. G. (2005). Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*, *20*(2), 101–105. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00201.x>
- Araby, E., & El-Tablawy, S. Y. (2016). Inhibitory effects of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) essential oil on pathogenicity of irradiated and non-irradiated *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *159*, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.024>
- Artini, M., Patsilidakos, A., Papa, R., Boović, M., Sabatino, M., Garzoli, S., Vrenna, G., Tilotta, M., Pepi, F., Ragno, R., & Selan, L. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activity and machine learning classification analysis of essential oils from different mediterranean plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, *23*(482). <https://doi.org/10.3390/molecules23020482>
- Ashwath, P., Deekshit, V. K., Rohit, A., Dhinakaran, I., Karunasagar, I., Karunasagar, I., & Akhila, D. S. (2022). Biofilm Formation and associated gene expression in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens. *Current Microbiology*, *79*(3). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02766-z>
- Avcioğlu, N. H., Sahal, G., & Bilkay, I. S. (2016). Antibiofilm effects of *Citrus limonum* and *Zingiber officinale* oils on biofilm formation of *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella terrigena* species. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *13*(6), 61–67. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i6.10>
- Babaei, S., Moradi, A., Hosseinikia, M., Mansouri zaveleh, O., Amiri, Z., & Sohrabi, N. (2018). Evaluation of the antimicrobial effects of *Satureja montana* essential oil alone and in combination with nisin on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Research in Medical and Dental Science*, *6*(2), 54–60. <https://doi.org/10.5455/jrmds.20186210>

- Bai A, J., & Vittal, R. R. (2014). Quorum sensing inhibitory and anti-biofilm activity of essential oils and their in vivo efficacy in food systems. *Food Biotechnology*, 28(3), 269–292. <https://doi.org/10.1080/08905436.2014.932287>
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(4), 235–244. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1026\(1998070\)13:4<235::aid-ffj733>3.3.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1026(1998070)13:4<235::aid-ffj733>3.3.co;2-k)
- Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mohammad A, M. (2019). Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *Journal of Food Science and Technology*, 16(90), 113–125.
- Başkan, C., Yıldırım, T., Bilgin, M., & Sivas, H. (2023). Determination of biofilm formation, antibiotic susceptibility profiles and quorum sensing mediated virulence factors in ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biologia*, 1(May). <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01429-z>
- Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R. C., & Dicko, M. H. (2010). Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, 15(11), 7825–7839. <https://doi.org/10.3390/molecules15117825>
- Beachey, E. H. (1981). Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Journal of Infectious Diseases*, 143(3), 325–345. <https://doi.org/10.1093/infdis/143.3.325>
- Beatović, D., Krstić-Milošević, D., Trifunović, S., Šiljegović, J., Glamoclija, J., Ristić, M., & Jelačić, S. (2015). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia. *Records of Natural Products*, 9(1), 62–75.
- Beaudoin, T., Zhang, L., Hinz, A. J., Parr, C. J., & Mah, T. F. (2012). The biofilm-specific antibiotic resistance gene *ndvB* is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3128–3136. <https://doi.org/10.1128/JB.06178-11>
- Becerril, R., Nerín, C., & Gómez-Lus, R. (2012). Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne*

- Pathogens and Disease*, 9(8), 699–705. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1097>
- Bekele, T., Tesfaye, A., Sewunet, T., & Waktola, H. D. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* isolates and their antimicrobial susceptibility pattern among catheterized patients at Jimma University Teaching Hospital, Jimma, Ethiopia. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1497-x>
- Bezbradica, D. I., Tomovic, J. M., Vukasinovic, M. S., Siler-Marinkovic, S., & Ristic, M. M. (2005). Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Satureja montana* L. collected in Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research*, 17(4), 462–465. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698965>
- Bezić, N., Skočibušić, M., & Dunkić, V. (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica*, 64(2), 313–322.
- Bhuiya, M., Sarkar, M. K. I., Sohag, M. H., Ali, H., Roy, C. K., Akther, L., & Sarker, A. F. (2018). Enumerating antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different sources in Dhaka city. *The Open Microbiology Journal*, 12(1), 172–180. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010172>
- Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Supplementum*, 136, 1–51. <https://doi.org/10.1111/apm.12099>
- Bojović, D., Šoškić, M., & Tadić, V. (2018). Comparative study of chemical composition of the essential oils from *Satureja cuneifolia* ten. and *Satureja montana* L., Lamiaceae collected at National Park Lovcen, Montenegro. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia*, 63(4), 167–180. <https://doi.org/10.24193/subbchem.2018.4.14>
- Božin, B., Mimica-Dukić, N., Samojlik, I., & Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7879–7885. <https://doi.org/10.1021/jf0715323>
- Božin, B., Mimica-Dukić, N., Simin, N., & Anačkov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1822–1828. <https://doi.org/10.1021/jf051922u>
- Butler, M. T., Wang, Q., & Harshey, R. M. (2010). Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3776–3781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910934107>
- Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., Ma,

- L., Ralston, B., Parsek, M. R., Anderson, E. M., Lam, J. S., & Wozniak, D. J. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 73(4), 622–638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x>
- Čabarkapa, I. (2015). *Sposobnost formiranja biofilma različitih sojeva Salmonella Enteritidis i inhibitorni efekat etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm*. Univerzitet u Novom sadu.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54(August), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., & Rahme, L. G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14613–14618. <https://doi.org/10.1073/pnas.251465298>
- Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., & Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111(3), 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.033>
- Ćavar, S., Šolić, M. E., & Maksimović, M. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of two *Satureja* species from Mt. Biokovo. *Botanica Serbica*, 38(1), 159–166.
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J. P., Bosch, J., & Soto, S. M. (2019). Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Microbial Drug Resistance* 72-79, 25(1), 72–79. <https://doi.org/doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>
- Ceylan, O., & Ugur, A. (2015). Chemical composition and anti-biofilm activity of *Thymus sipyleus* BOISS. subsp. *sipyleus* BOISS. var. *davisianus* RONNIGER essential oil. *Archives of Pharmacal Research*, 38(6), 957–965. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0516-0>
- Chen, T., Sheng, J., Fu, Y., Li, M., Wang, J., & Jia, A. Q. (2017). 1H NMR-Based Global Metabolic Studies of *Pseudomonas aeruginosa* upon exposure of the quorum sensing inhibitor resveratrol. *Journal of Proteome Research*, 16(2), 824–830. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00800>
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—

- present status and future perspectives. *Medicines*, 4(4), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Chovanová, R., Mezovská, J., Vaverková, & Mikulášová, M. (2015). The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species. *Letters in Applied Microbiology*, 61(1), 58–62. <https://doi.org/10.1111/lam.12424>
- Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>
- Çoban, A. Y., Çiftci, A., Onuk, E. E., Erturan, Z., Çayci, Y. T., & Durupinar, B. (2009). Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 43(4), 563–573.
- Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C. L., & Parsek, M. R. (2011). The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>
- Comin, V. M., Lopes, L. Q. S., Quatrin, P. M., de Souza, M. E., Bonez, P. C., Pintos, F. G., Raffin, R. P., Vaucher, R. de A., Martinez, D. S. T., & Santos, R. C. V. (2016). Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Microbial Pathogenesis*, 93, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.019>
- Copeland, M. F., & Weibel, D. B. (2009). Bacterial awarming: A model system for studying dynamic self-assembly. *Soft Matter*, 5(6), 1174–1187. <https://doi.org/10.1039/B812146J>. Bacterial
- Čopra-Janićijević, A., Vidic, D., & Maksimović, M. (2020). Characterisation of *Satureja montana* l. Essential oil and headspace volatiles. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 7(2), 22–34. <https://doi.org/10.37929/nveo.743706>
- Couladis, M., Tzakou, O., Mimica-Dukić, N., Jančić, R., & Stojanović, D. (2002). Essential oil of *Salvia officinalis* L. from Serbia and Montenegro. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(2), 119–126. <https://doi.org/10.1002/ffj.1065>
- Craft, J. D., Satyal, P., & Setzer, W. N. (2017). The chemotaxonomy of common sage (*Salvia officinalis*) based on the volatile constituents. *Medicines*, 4(3), 47. <https://doi.org/10.3390/medicines4030047>

- Damjanovic-Vratnica, B., Đakov, T., Šukovic, D., & Damjanovic, J. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild-growing *Salvia officinalis* L. from montenegro. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 11(1), 79–89. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643602>
- Damjanović-Vratnica, B., Perović, A., Šuković, D., & Perović, S. (2011). Effect of vegetation cycle on chemical content and antibacterial activity of *Satureja montana* L. *Archives of Biological Sciences*, 63(4), 1173–1179. <https://doi.org/10.2298/ABS1104173D>
- Dan, B., Dai, H., Zhou, D., Tong, H., & Zhu, M. (2023). Relationship between rug resistance characteristics and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Infection and Drug Resistance*, 16, 985–998. <https://doi.org/10.2147/IDR.S396609>
- Darzins, A. (1994). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 11(1), 137–153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00296.x>
- Das, A., Dey, S., Sahoo, R. K., Sahoo, S., & Subudhi, E. (2019). Antibiofilm and antibacterial activity of essential oil bearing *Zingiber officinale* Rosc. (Ginger) rhizome against multi-drug resistant isolates. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(4), 1163–1171. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1683080>
- David, B., Wolfender, J. L., & Dias, D. A. (2015). The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, 14(2), 299–315. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z>
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (2012). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(1998), 295–298. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
- De Araujo, C., Balestrino, D., Roth, L., Charbonnel, N., & Forestier, C. (2010). Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Research in Microbiology*, 161(7), 595–603. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.014>
- De Oliveira, T. L. C., de Araújo Soares, R., Ramos, E. M., das Graças Cardoso, M., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022>
- De Paula, S. B., Bartelli, T. F., Di Raimo, V., Santos, J. P., Morey, A. T., Bosini, M. A.,

- Nakamura, C. V., Yamauchi, L. M., & Yamada-Ogatta, S. F. (2014). Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 8. <https://doi.org/10.1155/2014/505204>
- de Sousa, T., Hébraud, M., Alves, O., Costa, E., Maltez, L., Pereira, J. E., Martins, Â., Igrejas, G., & Poeta, P. (2023). Study of antimicrobial resistance, biofilm formation, and motility of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urine samples. *Microorganisms*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051345>
- de Souza, de A. G. H., dos Santos Radai, J. A., Mattos Vaz, M. S., Esther da Silva, K., Fraga, T. L., Barbosa, L. S., & Simionatto, S. (2021). In vitro and in vivo antibacterial activity assays of carvacrol: A candidate for development of innovative treatments against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *PLOS ONE*, 16(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246003>
- Delamare Longaray, A. P., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100(2), 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.078>
- Dietrich, L. E. P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., & Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1308–1321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x>
- Djordjevic, Z. M., Folic, M. M., & Jankovic, S. M. (2017). Previous antibiotic exposure and antimicrobial resistance patterns of acinetobacter spp. and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with nosocomial infections. *Balkan Medical Journal*, 34(6), 527–533. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.2016.1844>
- Dodoš, T., Janković, S., Marin, P. D., & Rajčević, N. (2021). Essential oil composition and micromorphological traits of *Satureja montana* L., s. *subspicata* bartel ex vis., and s. *kitaibelii* wierzb. ex heuff. plant organs. *Plants*, 10(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10030511>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 9(5), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

- Dorđević, N., Mančić, S., Karabegović, I., Cvetković, D., Stanojević, J., Savić, D., & Danilović, B. (2021). Influence of the isolation method to the composition and antimicrobial and antioxidative activity of winter savory (*Satureja montana* L.) essential oil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 24(3), 386–399. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1933611>
- Dorđević, N., Mančić, S., Karabegović, I., Cvetković, D., Stanojević, J., Savić, D., & Danilović, B. (2022). The effect of distillation methods on the yield, composition and biological activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Advanced Technologies*, 11(2), 16–25. <https://doi.org/10.5937/savteh2202016d>
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>
- Đurović, S., Micić, D., Pezo, L., Radić, D., Bazarnova, J. G., Smyatskaya, Y. A., & Blagojević, S. (2022). The effect of various extraction techniques on the quality of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil, expressed by chemical composition, thermal properties and biological activity. *Food Chemistry: X*, 13(January). <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100213>
- Edward, E. A., El Shehawy, M. R., Abouelfetouh, A., & Aboulmagd, E. (2023). Prevalence of different virulence factors and their association with antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Egypt. *BMC Microbiology*, 23(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02897-8>
- El-Fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. A. M., El-Bialy, H. A., & Omara, A. M. A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.10.007>
- El-Hosseiny, L., El-Shenawy, M., Haroun, M., & Abdullah, F. (2014). Comparative evaluation of the inhibitory effect of some essential oils with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antibiotics*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/586252>
- El-Tablawy, S. Y., & Araby, E. (2017). Impact of marjoram (*Origanum marjorana* L.) essential oil on some virulence factors and DNA integrity of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(3), 63–71. <https://doi.org/10.9790/3008-1203016371>

- Elken, E. M., Tan, Z. N., Wang, Q., Jiang, X. Y., Wang, Y., Wang, Y. M., & Ma, H. X. (2022). Impact of sub-MIC eugenol on *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation via upregulation of rcsB. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.945491>
- EUCAST. (2015). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 5.0.*
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pags, J. M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - Bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.003>
- Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J. C., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(1), 35–40. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01259.x>
- Fang, H. H. P., Xu, L. C., & Chan, K. Y. (2002). Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*, 36(19), 4709–4716. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00207-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00207-5)
- Fernández-Billón, M., Llambías-Cabot, A. E., Jordana-Lluch, E., Oliver, A., & Macià, M. D. (2023). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilm*, 5(December). <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100129>
- Fletcher, E. L., Weissman, B. A., Efron, N., Fleiszig, S. M. J., Curcio, A. J., & Brennan, N. A. (1993). The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Current Eye Research*, 12(12), 1067–1071. <https://doi.org/10.3109/02713689309033504>
- Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., Kapsiotis, I., Panopoulou, M., Stavropoulou, E., Bezirtzoglou, E. E., & Alexopoulos, A. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(1), 23289. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.23289>
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Lynne Howell, P. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>

- Freter, R., & Jones, G. W. (1983). Models for studying the role of bacterial attachment in virulence and pathogenesis. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(4), 647–658.
- Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A Review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biology11121711>
- Gladikostić, N., Ikonjić, B., Teslić, N., Zeković, Z., Božović, D., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., & Pavlić, B. (2023). Essential oils from Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae and Lamiaceae families grown in Serbia: comparative chemical profiling with in vitro antioxidant activity. *Plants*, 12(4).
- Goswami, A. G., Basu, S., Banerjee, T., & Shukla, V. K. (2023). Biofilm and wound healing: from bench to bedside. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01121-7>
- Grădinaru, A. C., Trifan, A., Şpac, A., Brebu, M., Miron, A., & Aprotosoiaie, A. C. (2018). Antibacterial activity of traditional spices against lower respiratory tract pathogens: combinatorial effects of *Trachyspermum ammi* essential oil with conventional antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 67(5), 449–457. <https://doi.org/10.1111/lam.13069>
- Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 322–332. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199909/10\)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO;2-4)
- Gucwa, K., Milewski, S., Dymerski, T., & Szweda, P. (2018). Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* essential oils. *Molecules*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051116>
- Guerra, M. E. S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A. S., Ferraz, L. F. C., Hakansson, A. P., Darrieux, M., & Converso, T. R. (2022). *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877995>
- Hajdari, A., Mustafa, B., Kaçiku, A., Mala, X., Lukas, B., Ibraliu, A., Stefkov, G., & Novak, J. (2016). Chemical composition of the essential oil, total phenolics, total flavonoids and antioxidant activity of methanolic extracts of *Satureja montana* L. *Records of Natural Products*, 10(6), 750–760.
- Hammer, K. A., C.F. Carson, & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 9071(86), 985–990.

- Han, Y. L., Wen, X. H., Zhao, W., Cao, X. S., Wen, J. X., Wang, J. R., Hu, Z. De, & Zheng, W. Q. (2022). Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 13(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1003783>
- Hasanvand, T., Mohammadi, M., Abdollahpour, F., Kamarehie, B., Jafari, A., Ghaderpoori, A., & Karami, M. A. (2021). A comparative study on antibacterial activity of carvacrol and glutaraldehyde on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolates: an in vitro study. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19(1), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00620-1>
- Hemaiswarya, S., & Doble, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, 16(11), 997–1005. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.006>
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, W. J., Søren, M., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hübby, N., & Givskov, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors Morten. *The EMBO Journal*, 22(15), 3803–3815. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg366>
- Herman, A., Tambor, K., & Herman, A. (2016). Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Current Microbiology*, 72(2), 165–172. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0933-4>
- Hou, T., Sana, S. S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V. R., & Zhang, Z. (2022). Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. In *Food Bioscience* (Vol. 47, p. 101716). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101716>
- Hou, W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (2012). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(9), 5624–5631. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9114>
- Hsu, C. C., Lai, W. L., Chuang, K. C., Lee, M. H., & Tsai, Y. C. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 51(5), 473–482. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.743051>
- Huang, H. W., Liu, H. Y., Chuang, H. C., Chen, B. L., Wang, E. Y., Tsao, L. H., Ai, M. Y., & Lee, Y. J. (2023). Correlation between antibiotic consumption and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital implementing an antimicrobial

- stewardship program: A longitudinal observational study. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 56(2), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2022.08.017>
- Husain, Fohad M., Iqbal, A., S.Khan, M., Ahmad, E., Tahseen, Q., Khan, M. S., & Alshabib, N. A. (2015). Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00420>
- Husain, Fohad Mabood, Ahmad, I., Asif, M., & Tahseen, Q. (2013). Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biosciences*, 38(5), 835–844. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9385-9>
- Hussain, A. I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S. T., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108(3), 986–995. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.010>
- Ilić, A. S., Antić, M. P., Jelačić, S. C., & Šolević Knudsen, T. M. (2019). Chemical composition of the essential oils of three *Ocimum basilicum* L. cultivars from Serbia. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 347–351. <https://doi.org/10.15835/nbha47111250>
- Ilić, Z. S., Kevrešan, Ž., Šunić, L., Stanojević, L., Milenković, L., Stanojević, J., Milenković, A., & Cvetković, D. (2023). Chemical profiling and a antioxidant activity of wild and cultivated sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil. *Horticulturae*, 9(6), 624. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060624>
- Ilić, Z. S., Milenković, L., Šunić, L., Tmušić, N., Mastilović, J., Kevrešan, Ž., Stanojević, L., Danilović, B., & Stanojević, J. (2021). Efficiency of basil essential oil antimicrobial agents under different shading treatments and harvest times. *Agronomy*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy11081574>
- Ilić, Z. S., Milenković, L., Tmušić, N., Stanojević, L., Stanojević, J., & Cvetković, D. (2022). Essential oils content, composition and antioxidant activity of lemon balm, mint and sweet basil from Serbia. *Lwt*, 153(May 2021). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112210>
- İpek, D. (2023). Evaluattion o quorum sensing signals of strong biofilm producing bacteria via LC-MSMS , HPLC and biosensor. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.23902/trkjnat.1276562>
- Iseppi, R., Cerbo, A. Di, Aloisi, P., Manelli, M., Pellesi, V., Provenzano, C., Camellini, S., Messi, P., & Sabia, C. (2020). In vitro activity of essential oils against planktonic and

- biofilm cells of extended-spectrum β -Lactamase (ESBL)/Carbapenamase-producing gram-negative bacteria involved in human nosocomial infections. *Antibiotics*, 9(272), 1–12.
- Ivanović, M., & Vučetić, M. (2006). Microbial biofilms - part I: Ecological and genetical aspects. *Stomatoloski Glasnik Srbije*, 53(1), 35–41. <https://doi.org/10.2298/sgs0601035i>
- Janabi, A. A. H. S. AL. (2018). Inhibitory action of essential oils on quorum sensing activity of *Pseudomonas aeruginosa* by effecting on pyocyanin production. *Archives of Medical Biotechnology*, 1(2), 9–12.
- Javiya, V. A., Ghatak, S. B., Patel, K. R., & Patel, J. A. (2008). Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care hospital in Gujarat, India. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(5), 230–234. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.44156>
- Jažo, Z., Glumac, M., Paštar, V., Bektić, S., Radan, M., & Carev, I. (2023). Chemical composition and biological activity of *Salvia officinalis* L. Essential Oil. *Plants*, 12(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants12091794>
- Jelačić, S., Beatović, D., Prodanović, S., Tasić, S., Moravčević, D., Vujošević, A., & Vučković, S. (2011). Chemical composition of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L. Lamiaceae). *Hemijaska Industrija*, 65(4), 465–471. <https://doi.org/10.2298/HEMIND110227020J>
- Jianu, C., Mihail, R., Muntean, S. G., Pop, G., Daliborca, V. C., Horhat, F. G., & Nitu, R. (2015). Composition and antioxidant capacity of essential oils obtained from *Thymus vulgaris*, *Thymus pannonicus* and *Satureja montana* grown in Western Romania. *Revista de Chimie*, 66(12), 2157–2160.
- Jug-Dujaković, M., Ristić, M., Pljevljakušić, D., Dajić-Stevanović, Z., Liber, Z., Hančević, K., Radić, T., & Šatović, Z. (2012). High diversity of indigenous populations of dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) in essential-oil composition. *Chemistry and Biodiversity*, 9(10), 2309–2323. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200131>
- Kabha, K., Nissimov, L., Athamna, A., Keisari, Y., Parolis, H., Parolis, L. A. S., Grue, R. M., Schlepper-Schafer, J., Ezekowitz, A. R. B., Ohman, D. E., & Ofek, I. (1995). Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 63(3), 847–852. <https://doi.org/10.1128/iai.63.3.847-852.1995>
- Kádár, B., Szász, M., Kristóf, K., Pesti, N., Krizsán, G., Szentandrassy, J., Rókus, L., Nagy, K., & Szabó, D. (2010). In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Acta*

- Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 57(3), 235–245.
<https://doi.org/10.1556/AMicr.57.2010.3.8>
- Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829.
<https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Kalia, M., Yadav, V. K., Singh, P. K., Sharma, D., Pandey, H., Narvi, S. S., & Agarwal, V. (2015). Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 10(8), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135495>
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205–218.
<https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
- Kaspersen, H., Urdahl, A. M., Franklin-Alming, F. V., Ilag, H. K., Hetland, M. A. K., Bernhoff, E., Löhr, I. H., & Sunde, M. (2023). Population dynamics and characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from healthy poultry in Norway. *Frontiers in Microbiology*, 14(May), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1193274>
- Kearns, D. B. (2011). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405.A>
- Khaertynov, K. S., Anokhin, V. A., Rizvanov, A. A., Davidyuk, Y. N., Semyenova, D. R., Lubin, S. A., & Skvortsova, N. N. (2018). Virulence factors and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from neonates with sepsis. *Frontiers in Medicine*, 5(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00225>
- Khalaf, Z. Z., & Zahra, L. A. (2020). Evaluation of the activity of essential oil and hydrosol from *Eucalyptus camaldulensis* against some bacterial species. *Iraqi Journal of Science*, 61(6), 1282–1288. <https://doi.org/10.24996/ijs.2020.61.6.5>
- Khalil, R., & Li, Z. G. (2011). Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8397–8402.
<https://doi.org/10.5897/ajb10.2615>
- Khalilzadeh, P., Lajoie, B., El Hage, S., Furiga, A., Baziard, G., Berge, M., & Roques, C. (2010). Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by an N -butanoyl- l -homoserine lactone analog . *Canadian Journal of Microbiology*, 56(4), 317–325.
<https://doi.org/10.1139/w10-013>
- Khan, F., Pham, D. T. N., Oloketuyi, S. F., & Kim, Y. M. (2020). Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 104(1), 33–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10201-w>
- Khan, M. S. A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2009). Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters in Applied Microbiology*, 49(3), 354–360. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02666.x>
- Kim, H. S., & Park, H. D. (2013). Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS ONE*, 8(9), e76106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076106>
- Kim, Y. G., Lee, J. H., Kim, S. Il, Baek, K. H., & Lee, J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 195(2015), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.028>
- Kipnis, E., & Sawa, T. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis thérapeutiques ciblant les mécanismes pathogéniques de *Pseudomonas aeruginosa*. *Medicine et Maladies Infectieuses*, 36(2006), 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>
- Koba, K., Poutoli, P. W., Raynaud, C., Chautmont, J. P., & Sanda, K. (2009). Chemical composition and antimicrobial properties of different basil essential oils chemotypes from Togo. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.3329/bjp.v4i1.998>
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., Delden, C. Van, & Pechere, J.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5990–5996. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000>
- Kon, K. V., & Rai, M. K. (2012). Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(7), 775–790. <https://doi.org/10.1586/eri.12.57>
- Kostić, E., Kitić, D., Vujović, M., Marković, M., Pavlović, A., & Stojanović, G. (2022). A chemometric approach to the headspace sampled volatiles of selected *Salvia* species from Southeastern Serbia. *Botanica Serbica*, 46(2), 285–294. <https://doi.org/10.2298/BOTSERB2202285K>
- Kovačević, Z., Kladar, N., Čabarkapa, I., Radinović, M., Maletić, M., Erdeljan, M., & Božin, B. (2021). New perspective of *Origanum vulgare* L. and *Satureja montana* L. essential oils as bovine mastitis treatment alternatives. *Antibiotics*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121460>

- Kulić, M., Drakul, D., Sokolović, D., Kordić-Bojinović, J., Milovanović, S., & Blagojević, D. (2023). Essential oil of *Satureja montana* L. from Herzegovina: Assessment of composition, antispasmodic, and antidiarrheal effects. *Records of Natural Products*, 17(3), 536–548. <https://doi.org/10.25135/rnp.358.2207.2522>
- Kundaković, T., Stanojković, T., Kolundžija, B., Marković, S., Šukilović, B., Milenković, M., & Lakušić, B. (2014). Cytotoxicity and antimicrobial activity of the essential oil from *Satureja montana* subsp. *pisidica* (Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 9(4), 569–572. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400900437>
- Kustrak, D., Kuftinec, J., Blazevic, N., & Maffei, M. (1996). Comparison of the essential oil composition of two subspecies of *Satureja montana*. *Journal of Essential Oil Research*, 8(1), 7–13. <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700546>
- Kwiatkowski, P., Sienkiewicz, M., Pruss, A., Łopusiewicz, Ł., Arsyńska, N., Wojciechowska-Koszko, I., Kilanowicz, A., Kot, B., & Dołęgowska, B. (2022). Antibacterial and antibiofilm activities of essential oil compounds against new delhiMetallo-β-Lactamase-1-producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antibiotics*, 11(147), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020147>
- Lakušić, B. S., Ristić, M. S., Slavkowska, V. N., Stojanović, D. L. J., & Lakušić, D. V. (2013). Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. *Botanica Serbica*, 37(2), 127–140.
- Lambert, P. A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(41), 22–26.
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. A., & Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 40, Issue 1, pp. 76–94). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219>
- Leonard, C. M., Virijevec, S., Regnier, T., & Combrinck, S. (2010). Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *South African Journal of Botany*, 76(4), 676–680. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.07.002>
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081. <https://doi.org/doi.org/10.2217/fmb.14.48>
- Lima, J. L. da C., Alves, L. R., Jacomé, P. R. L. de A., Bezerra Neto, J. P., Maciel, M. A. V., & Morais, M. M. C. de. (2018). Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22(2), 129–136.

- <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.03.003>
- Lindhout, T., Lau, P. C. Y., Brewer, D., & Lam, J. S. (2009). Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology*, *155*(10), 3449–3460. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030510-0>
- Liu, X., Cai, J., Chen, H., Zhong, Q., Hou, Y., Chen, W., & Chen, W. (2020). Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, *141*, 103980. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103980>
- Lorenzi, V., Muselli, A., Bernardini, A. F., Berti, L., Pagès, J. M., Amaral, L., & Bolla, J. M. (2009). Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(5), 2209–2211. <https://doi.org/10.1128/AAC.00919-08>
- Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Barroso, C. D. N., Tuon, F. F., & Faoro, H. (2022). Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 15779. <https://doi.org/10.3390/ijms232415779>
- Luciardi, M. C., Blázquez, M. A., Cartagena, E., Bardón, A., & Arena, M. E. (2016). Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT - Food Science and Technology*, *68*(5), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.056>
- Maccelli, A., Vitanza, L., Imbriano, A., Frascetti, C., Filippi, A., Goldoni, P., Maurizi, L., Ammendolia, M. G., Crestoni, M. E., Fornarini, S., Menghini, L., Carafa, M., Marianecchi, C., Longhi, C., & Rinaldi, F. (2020). *Satureja montana* L. Essential oils: Chemical profiles/phytochemical screening, antimicrobial activity and o/w nanoemulsion formulations. *Pharmaceutics*, *12*(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010007>
- Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, *6*(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00165>
- Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., & O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, *426*(6964), 306–310. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
- Mahmoud, A. M., El-Baky, R. M. A., Ahmed, A. B. F., & Gad, G. F. M. (2016). Antibacterial activity of essential oils and in combination with some standard antimicrobials against

- different pathogens isolated from some clinical specimens. *American Journal of Microbiological Research*, 4(1), 16–25. <https://doi.org/10.12691/ajmr-4-1-2>
- Maksimović, M., Vidic, D., Miloš, M., Edita Šolić, M., Abadžić, S., & Siljak-Yakovlev, S. (2007). Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(8), 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.02.005>
- Marić, S., Maksimović, M., & Miloš, M. (2006). The impact of the locality altitudes and stages of development on the volatile constituents of *Salvia officinalis* L. From Bosnia and Herzegovina. *Journal of Essential Oil Research*, 18(2), 178–180. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699060>
- Marin, M., Novaković, M., Tešević, V., Vučković, I., Milojević, N., Vuković-Gačić, B., & Marin, P. D. (2012). Antioxidative, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of wild-growing *Satureja montana* L. from Dalmatia, Croatia. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(3), 216–223. <https://doi.org/10.1002/ffj.3082>
- Marotti, M., Piccaglia, R., & Giovanelli, E. (1996). Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3926–3929. <https://doi.org/10.1021/jf9601067>
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Mastelić, J., & Jerković, I. (2003). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. *Food Chemistry*, 80(1), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00346-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00346-1)
- Matković, A., Marković, T., Vrbničanin, S., Sarić-Krsmanović, M., & Božić, D. (2018). Chemical composition and in vitro herbicidal activity of five essential oils on Johnson grass (*Sorghum halepense*) [L.] Pers.). *Lekovite Sirovine*, 38(38), 44–50. <https://doi.org/10.5937/leksir1838044m>
- McCartney, A. L., & Hoyles, L. (2023). The role of *Klebsiella* populations in preterm infants. *Biochemical Society Transactions*, 51(2), 887–896. <https://doi.org/10.1042/BST20200325>
- Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Aghdam, M. A., & Kafil, H. S. (2017). Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, 28(2), 63–68. <https://doi.org/10.1097/MRM.000000000000100>

- Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Jovanović, V. S., Mitić, V., Stojanović-Radić, Z., & Zlatković, B. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and anticholinesterase activity of *Satureja montana* L. ssp *montana* essential oil. *Central European Journal of Biology*, 9(7), 668–677. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0298-x>
- Mihalik, K., Chung, D. W., Crixell, S. H., McLean, R. J. C., & Vattem, D. A. (2008). Quorum sensing modulators of *Pseudomonas aeruginosa* characterized in *Camellia sinensis*. *Asian Journal of Traditional Medicine*, 3(1), 12–23.
- Mikulášová, M., Chovanová, R., & Vaverková, Š. (2016). Synergism between antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in coping with multidrug-resistant staphylococci. *Phytochemistry Reviews*, 15(4), 651–662. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9458-0>
- Miladi, H., Ben Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2013). Chemical composition and cytotoxic and antioxidant activities of *Satureja montana* L. essential oil and its antibacterial potential against *Salmonella* spp. strains. *Journal of Chemistry*, 2013, 9. <https://doi.org/10.1155/2013/275698>
- Miladi, H., Mili, D., Slama, R. Ben, Zouari, S., Ammar, E., & Bakhrouf, A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.017>
- Miladinović, D., & Miladinović, L. (2000). Antimicrobial activity of essential oil of sage from Serbia. *Physics, Chemistry and Technology*, 2(2), 97–100.
- Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., Petrović, J., Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., & Petrović, J. (2008). Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv Veterinarske Medicine*, 1(2), 1–9.
- Milenković, L., Šunić, L., Mastilović, J., Kevrešan, Ž., Kovač, R., Cvetković, D., Stanojević, L., Danilović, B., Stanojević, J., Stanojević, & Ilić, Z. S. (2022). Antimicrobial activity od essential oils rom medical plants grown in light modiied enviroment. *Bitenčevi Živilski Dnevi, Ljubljana, June*.
- Milenković, M. T., Božić, D. D., Slavkowska, V. N., & Lakušić, B. S. (2015). Synergistic effects of *Salvia officinalis* L. essential oils and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archives of Biological Sciences*, 67(3), 949–956. <https://doi.org/10.2298/ABS141119057M>
- Milić, M., & Miljač, V. (2019). Beta laktamaze proširenog spektra delovanja kod reda Enterobacterales: klasifikacijai genetska osnova rezistencije. *Medicinski Podmladak*,

- 70(2), 1–7. <https://doi.org/10.5937/mp70-20377>
- Miller, M. J., & Ahearn, D. G. (1987). Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic contact lenses and other substrata. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(8), 1392–1397. [https://doi.org/0095-1137/87/081392-06\\$02.00/0](https://doi.org/0095-1137/87/081392-06$02.00/0)
- Milojković, M., Nenadović, A., Stanković, S., Božić, D. D., Nedeljković, N. S., Āirković, I., Petrović, M., & Dimkić, I. (2020). Phenotypic and genetic properties of susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Southern Serbia. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 71(3), 231–250. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3418>
- Milos, M., Radonic, A., Bezic, N., & Dunkic, V. (2001). Localities and seasonal variations in the chemical composition of essential oils of *Satureja montana* L. and *S. cuneifolia* ten. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(3), 157–160. <https://doi.org/10.1002/ffj.965>
- Mishra, S., Gupta, A., Upadhye, V., Singh, S. C., Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2023). Therapeutic strategies against biofilm infections. *Life*, 13(172), 1–24. <https://doi.org/10.3390/life13010172>
- Mitić-Culafić, D., Vuković-Gaćić, B., Knezević-Vukcević, J., Stanković, S., & Simić, D. (2005). Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Archives of Biological Sciences*, 57(3), 173–178. <https://doi.org/10.2298/abs0503173m>
- Mladenović, Z. M. (2017). *Kombinatorne biblioteke odabranih prirodnih i sintetskih biološki aktivnih estara Combinatorial libraries of selected natural and synthetic biologically active esters*. Univerzitet u Nišu.
- Mohamed, E. A., Nawar, A. E., & Hegazy, E. E. (2023). Insight into quorum sensing genes lasR and rhlR, their related virulence factors and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ocular infections. *Microbes and Infectious Diseases*, 4(2), 575–589. <https://doi.org/10.21608/MID.2023.197968.1480>
- Mohamed, S. H., Mohamed, M. S. M., Khalil, M. S., Azmy, M., & Mabrouk, M. I. (2018). Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 84–95. <https://doi.org/10.1111/jam.13755>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Muráriková, A., Ťažký, A., Neugebauerová, J., Planková, A., Jampílek, J., Mučaji, P., &

- Mikuš, P. (2017). Characterization of essential oil composition in different basil species and pot cultures by a GC-MS method. *Molecules*, 22(7), 1221. <https://doi.org/10.3390/molecules22071221>
- Murray, T. S., & Kazmierczak, B. I. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2700–2708. <https://doi.org/10.1128/JB.01620-07>
- Musk, D. J., Banko, D. A., & Hergenrother, P. J. (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry and Biology*, 12(7), 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.05.007>
- Nasrin, S., Hegerle, N., Sen, S., Nkeze, J., Sen, S., Permala-Booth, J., Choi, M., Sinclair, J., Tapia, M. D., Johnson, J. K., Sow, S. O., Thaden, J. T., Fowler, V. G., Krogfelt, K. A., Brauner, A., Protonotariou, E., Christaki, E., Shindo, Y., Kwa, A. L., Tennant, S. M. (2022). Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection. *BMC Microbiology*, 22(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02427-4>
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Neog, N., Phukan, U., Puzari, M., Sharma, M., & Chetia, P. (2021). *Klebsiella oxytoca* and Emerging Nosocomial Infections. *Current Microbiology*, 78(4), 1115–1123. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02402-2>
- Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B., & Costerton, J. W. (1985). Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(4), 619–624.
- Niculae, M., Spînu, M., Şandru, C. D., Cadar, D., Szakacs, B., Scurtu, I., Bolfă, P., & Mateş, C. I. (2009). Antimicrobial potential of some Lamiaceae essential oils against animal multiresistant bacteria. *Lucrari Ştiinţifice Medicină Veterinară*, 42(1), 170–175. https://www.researchgate.net/profile/Marina_Spinu/publication/228771278_Antimicrobial_potential_of_some_Lamiaceae_essential_oils_against_animal_multiresistant_bacteria/links/0fcfd505a1d4e29dd4000000.pdf,
- Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S., &

- Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*, *61*, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.011>
- Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrnunissa, F., Wijaya, F., Napitupulu, S., Hati, V. P., Hakim, M. S., Meliala, A., Aman, A. T., & Nuryastuti, T. (2019). Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings*, *13*(Suppl 11), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7>
- Niu, C., & Gilbert, E. S. (2004). Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 6951–6956. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.6951-6956.2004>
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2003). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *285*(5), L1077–L1086. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00198.2003>
- O'May, C., & Tufenkji, N. (2011). The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(9), 3061–3067. <https://doi.org/10.1128/AEM.02677-10>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, *30*(2), 295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Opalchenova, G., & Obreshkova, D. (2003). Comparative studies on the activity of basil - An essential oil from *Ocimum basilicum* L. - Against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological Methods*, *54*(1), 105–110. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00012-5)
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., & Hancock, R. E. W. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, *190*(8), 2671–2679. <https://doi.org/10.1128/JB.01659-07>
- Overhage, J., Lewenza, S., Marr, A. K., & Hancock, R. E. W. (2007). Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux

- mutant library. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 2164–2169. <https://doi.org/10.1128/JB.01623-06>
- Oyedemi, S. O., Okoh, a I., Mabinya, L. V, Pirochenva, G., & Afolayan, a J. (2009). The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, -terpineol and γ -terpinene against *Listeria*. *African Journal of Biotechmology*, 8(7), 1280–1286.
- Özcan, M., & Chalchat, J.-C. (2002). Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(6), 223–228. <https://doi.org/10.17221/3536-cjfs>
- Ozidal, M. (2019). A new strategy for the efficient production of pyocyanin, a versatile pigment, in *Pseudomonas aeruginosa* OG1 via toluene addition. *3 Biotech*, 9(10), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1907-1>
- Pacheco, T., Gomes, A. É. I., Siqueira, N. M. G., Assoni, L., Darrieux, M., Venter, H., & Ferraz, L. F. C. (2021). SdiA, a quorum-sensing regulator, suppresses fimbriae expression, biofilm formation, and quorum-sensing molecules production in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 12(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.597735>
- Packiavathy, I. A. S. V., Priya, S., Pandian, S. K., & Ravi, A. V. (2014). Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, 148, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.002>
- Packiavathy, V. I. A. S., Agilandesar, P., Khadar, M. S., Pandian, S. K., & Veera Ravi, A. (2012). Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International*, 45(1), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.022>
- Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00078-15>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Papa, R., Garzoli, S., Vrenna, G., Sabatino, M., Sapienza, F., Relucenti, M., Donfrancesco, O., Fiscarelli, E. V., Artini, M., Selan, L., & Ragno, R. (2020). Essential oils biofilm modulation activity, chemical and machine learning analysis. Application on *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patients. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 21(23), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21239258>
- Park, S. N., Lim, Y. K., Freire, M. O., Cho, E., Jin, D., & Kook, J. K. (2012). Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, 18(3), 369–372. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.001>
- Patil, S., Nikam, M., Patil, H., Anokhina, T., Kochetkov, V., & Chaudhari, A. (2017). Bioactive pigment production by *Pseudomonas* spp. MCC 3145: Statistical media optimization, biochemical characterization, fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity. *Process Biochemistry*, 58, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.003>
- Pavlić, B., Savić, D., Vladić, J., Vidović, S., & Zeković, Z. (2018). Comparative analysis of the essential oils of three Lamiaceae species obtained by conventional and microwave-assisted hydrodistillation. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 22(4), 174–179. <https://doi.org/10.5937/jpea1804174p>
- Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H., & Williams, D. W. (2011). Introduction to Biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine*, 6, 41–68. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21289-5_2
- Piras, A., Gonçalves, M. J., Alves, J., Falconieri, D., Porcedda, S., Maxia, A., & Salgueiro, L. (2018). *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils. *Industrial Crops and Products*, 113(December 2017), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.024>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 11, Issue 4, pp. 589–603). <https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589>
- Politeo, O., Jukic, M., & Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101(1), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.045>
- Popović, A., Šučur, J., Orčić, D., & Štrbac, P. (2013). Efikasnost etarskih ulja na odrasle insekte *Tribolium castaneum* (Herbst) (Col., Tenebrionidae). *Journal of Central European Agriculture*, 14(2), 181–193. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/14.2.1246>
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285–293. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x>
- Preda, V. G., & Săndulescu, O. (2019). Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*, 7(3), e10. <https://doi.org/10.15190/d.2019.13>
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. P., & Newman, D. K. (2006). Rethinking “secondary”

- metabolism: Physiological roles for phenazine antibiotics. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 2, Issue 2, pp. 71–78). <https://doi.org/10.1038/nchembio764>
- Pripdeevech, P., Chumpolsri, W., Suttiarporn, P., & Wongpornchai, S. (2010). The chemical composition and antioxidant activities of basil from Thailand using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(11), 1503–1513. <https://doi.org/10.2298/JSC100203125P>
- Qian, W., Sun, Z., Wang, T., Yang, M., Liu, M., Zhang, J., & Li, Y. (2020). Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 139(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103924>
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Raal, A., Orav, A., & Arak, E. (2007). Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from various European countries. *Natural Product Research*, 21(5), 406–411. <https://doi.org/10.1080/14786410500528478>
- Radonić, A., & Miloš, M. (2003). Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. *Free Radical Research*, 37(6), 673–679. <https://doi.org/10.1080/1071576031000105643>
- Radulescu, V., Chiliment, S., & Oprea, E. (2004). Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1027(1–2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.046>
- Radulović, N., Blagojević, P., Stojanović-Radić, Z., & Stojanović, N. (2013). Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry*, 20(7), 932–952. <https://doi.org/10.2174/0929867311320070008>
- Radulović, N. S., Blagojević, P. D., & Miltojević, A. B. (2013). α -Linalool - a marker compound of forged/synthetic sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3292–3303. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6175>
- Radulović, N. S., Genčić, M. S., Stojanović, N. M., Randjelović, P. J., Stojanović-Radić, Z. Z., & Stojiljković, N. I. (2017). Toxic essential oils. Part V: Behaviour modulating and toxic properties of thujones and thujone-containing essential oils of *Salvia officinalis* L.,

- Artemisia absinthium* L., *Thuja occidentalis* L. and *Tanacetum vulgare* L. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 355–369. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.044>
- Radulović, N. S., Stojanović, N. M., Glišić, B., Randjelović, P. J., Stojanović-Radić, Z. Z., Mitić, K. V., Nikolić, M. G., & Djuran, M. I. (2018). Water-soluble gold(III) complexes with N-donor ligands as potential immunomodulatory and antibiofilm agents. *Polyhedron*, 141(December), 164–180. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.11.044>
- Raei, P., Poulak, T., Memar, M. Y., Alizadeh, N., Aghamali, M., Zeinalzadeh, E., Kafil, H. S., & Asgharzadeh, M. (2017). Thymol and carvacrol strongly inhibit biofilm formation and growth of carbapenemase- producing Gram negative bacilli. *Cellular and Molecular Biology*, 63(5), 108–112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2017.63.5.20>
- Copyright:
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & Jaziri, M. El. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, 17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4885–4890. <https://doi.org/10.1073/pnas.060030097>
- Reichling, J. (2020). Anti-biofilm and virulence factor-reducing activities of essential oils and oil components as a possible option for bacterial infection control. *Planta Medica*, 86(8), 520–537. <https://doi.org/10.1055/a-1147-4671>
- Riwu, K. H. P., Effendi, M. H., Rantam, F. A., Khairullah, A. R., & Widodo, A. (2022). A review: virulence factors of *Klebsiella pneumonia* as emerging infection on the food chain. *Veterinary World*, 15(9), 2172–2179. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2172-2179>
- Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Goffredo, E., Goga, B. C., & Paparella, A. (2016). Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. *Italian Journal of Food Safety*, 5(5793), 154–157. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5793>
- Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection, Supplement*, 11(4), 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01161.x>
- Sakkas, H., Gousia, P., Economou, V., Sakkas, V., Petsios, S., & Papadopoulou, C. (2016). In

- vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(3), 212–218. <https://doi.org/10.5455/jice.20160331064446>
- Sánchez-Jiménez, A., Llamas, M. A., & Marcos-Torres, F. J. (2023). Transcriptional regulators controlling virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 1–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms241511895>
- Sandasi, M., Leonard, C. M., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African Journal of Botany*, 77(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.011>
- Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, A. M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19(11), 1070–1075. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.11.006>
- Santos, J. D. C., Coelho, E., Silva, R., Passos, C. P., Teixeira, P., Henriques, I., & Coimbra, M. A. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* byproducts essential oils. *Industrial Crops and Products*, 137(February), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.058>
- Sarić-Krsmanović, M., Gajić Umiljendić, J., Radivojević, L., Šantrić, L., Potočnik, I., & Đurović-Pejčev, R. (2019). Bio-herbicidal effects of five essential oils on germination and early seedling growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.). *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(4), 247–251. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1550309>
- Scheie, A. A., & Petersen, F. C. (2004). The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(1), 4–12.
- Schillaci, D., Napoli, E. M., Cusimano, M. G., Vitale, M., & Ruberto, G. (2013). *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *Journal of Food Protection*, 76(10), 1747–1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-001>
- Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A., & Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology*, 10(179). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>
- Schurtz Sebghati, T. A., Korhonen, T. K., Hornick, D. B., & Clegg, S. (1998). Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infection and Immunity*, 66(6), 2887–2894. <https://doi.org/10.1128/iai.66.6.2887-2894.1998>
- Seder, N., Rayyan, W. A., Al-Fawares, L., Hilmi, M., & Bakar, A. (2022). *Pseudomonas*

- aeruginosa* virulence factors and antivirulence mechanisms to combat drug resistance; A systematic review. *Sapporo Medical Journal*, 56(12), 1–23.
- Selim, S. A., Adam, M. E., Hassan, S. M., & Albalawi, A. R. (2014). Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(19), 1–8.
- Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M. L., & Marques, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1554–1560. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4347>
- Shao, X., Yao, C., Ding, Y., Hu, H., Qian, G., He, M., & Deng, X. (2022). The transcriptional regulators of virulence for *Pseudomonas aeruginosa*: Therapeutic opportunity and preventive potential of its clinical infections. *Genes and Diseases*, 10(5), 2049–2063. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.09.009>
- Sharifi-Rad, J., Hoseini-Alfatemi, S. M., Sharifi-Rad, M., Sharifi-Rad, M., Iriti, M., Sharifi-Rad, M., Sharifi-Rad, R., & Raeisi, S. (2015). Phytochemical compositions and biological activities of essential oil from *Xanthium strumarium* L. *Molecules*, 20(4), 7034–7047. <https://doi.org/10.3390/molecules20047034>
- Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N., Gangwal, A., Gupta, M., & Singh, Y. (2017). Bacterial virulence factors: Secreted for survival. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0625-1>
- Silva, M. G. D. V., Matos, F. J. de A., Lopes, P. R. O., Silva, F. O., & Holanda, M. T. (2004). Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO₂ extraction. *Arkivoc*, 2004(6), 66–71. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0005.609>
- Silva, V. A., Da Sousa, J. P., De Luna Freire Pessôa, H., De Freitas, A. F. R., Coutinho, H. D. M., Alves, L. B. N., & Lima, E. O. (2016). *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Pharmaceutical Biology*, 54(5), 863–867. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1088551>
- Singh, B. R. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. sage oil on veterinary clinical isolates of bacteria. *Noto-Are: Medicine*, November, 11–27.
- Skočibušić, M., & Bezić, N. (2004a). Chemical composition and antimicrobial variability of *Satureja montana* L. essential oils produced during ontogenesis. *Journal of Essential Oil Research*, 16(4), 387–391. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698751>

- Skočibušić, M., & Bezić, N. (2004b). Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 967–970. <https://doi.org/10.1002/ptr.1489>
- Slavkovska, V., Jancic, R., Bojovic, S., Milosavljevic, S., & Djokovic, D. (2001). Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. from the central part of the Balkan peninsula. *Phytochemistry*, 57(1), 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00458-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00458-1)
- Šmitran, A. M. (2013). *Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na formiranje biofilma i vezivanje za komponente matriksa invazivnih i neinvazivnih izolata beta hemolitičkog streptokoka grupe A*. Univerzitet u Beogradu.
- Šojić, B., Ikonić, P., Kocić-Tanackov, S., Peulić, T., Teslić, N., Županjac, M., Lončarević, I., Zeković, Z., Popović, M., Vidaković, S., & Pavlić, B. (2023). Antibacterial Activity of Selected essential oils against foodborne pathogens and their application in fresh Turkey Sausages. *Antibiotics*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010182>
- Šojić, B., Pavlić, B., Tomović, V., Ikonić, P., Zeković, Z., Kocić-Tanackov, S., Đurović, S., Škaljac, S., Jokanović, M., & Ivić, M. (2019). Essential oil versus supercritical fluid extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) – Assessment of the oxidative, microbiological and sensory quality of fresh pork sausages. *Food Chemistry*, 287(November 2018), 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.137>
- Šojić, B., Tomović, V., Savanović, J., Kocić-Tanackov, S., Pavlić, B., Jokanović, M., Milidrag, A., Martinović, A., Vujadinović, D., & Vukić, M. (2021). Sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil as a potential replacement for sodium nitrite in dry fermented sausages. *Processes*, 9(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pr9030424>
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>
- Soumya, E. abed, Koraichi, S. I., Hassan, L., Ghizlane, Z., Hind, M., & Adnane, R. (2011). Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20), 3229–3232. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.275>
- Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of Essential Oils: A Review. *Polymers*, 14(9), 1730. <https://doi.org/10.3390/polym14091730>

- Šovljanski, O., Savelji, A., Aćimović, M., Šeregelj, V., Lato, P., Tomić, A., Četković, G., & Tešević, V. (2022). Biological profiling of essential oils and xydrolates of *Ocimum basilicum* var. *Genovese* and var. *minimum* Originated from Serbia. *Processes*, 10(9). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pr10091893>
- Stahlhut, S. G., Struve, C., Krogfelt, K. A., & Reisner, A. (2012). Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65(2), 350–359. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00965.x>
- Stajković, O., Beric-Bjedov, T., Mitić-Ćulafić, D., Stanković, S., Vuković-Gačić, B., Simić, D., & Knežević-Vukčević, J. (2007). Antimutagenic properties of Basil (*Ocimum basilicum* L.) in *Salmonella typhimurium* TA100. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 213–217.
- Stanković Nedeljković, N., Kocić, B., Tiodorović, B., Branković, S., & Mladenović Antić, S. (2011). Serotipizacija i analiza vrsta proizvedenih pigmenata kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa*. *Vojnosanitetski Pregled*, 68(11), 923–929. <https://doi.org/10.2298/VSP1111923S>
- Stanojević, L. P., Marjanović-Balaban, Z. R., Kalaba, V. D., Stanojević, J. S., Cvetković, D. J., & Cakić, M. D. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20(6), 1557–1569. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1401963>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. Di, Djukić, S., Čirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115, 891–899. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm>
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107–113. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00196>
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135–138. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1)
- Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Joković, N., Jokanović, M., Ivić, M., Šojić, B., Škaljac, S., Stojanović, P., & Mihajilov-Krstev, T. (2018). Inhibition of *Salmonella Enteritidis* growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination. *Food Control*, 90, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.013>

- Stojanović-Radić, Zorica, Čomić, L., Radulović, N., Blagojević, P., Mihajilov-Krstev, T., & Rajković, J. (2012). Commercial *Carlinae radix* herbal drug: Botanical identity, chemical composition and antimicrobial properties. *Pharmaceutical Biology*, 50(8), 933–940. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.649214>
- Strateva, T., & Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology*, 61(4), 717–732. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0273-y>
- Štrbac, F., Bosco, A., Maurelli, M. P., Ratajac, R., Stojanović, D., Simin, N., Orčić, D., Pušić, I., Krnjajić, S., Sotiraki, S., Saralli, G., Cringoli, G., & Rinaldi, L. (2022). Anthelmintic properties of essential oils to control gastrointestinal Nematodes in sheep—In vitro and in vivo studies. *Veterinary Sciences*, 9(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/vetsci9020093>
- Štrbac, F., Simin, N., Orčić, D., Bosco, A., Stojanović, D., Petrović, K., Ratajac, R., Cringoli, G., & Rinaldi, L. (2022). Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil and its anthelmintic properties against sheep gastrointestinal Nematodes. *Serbian Biochemical Society Eleventh Conference (Scientific Meeting of an International Character)- "Amazing Biochemistry" Faculty of Chemistry, University of Belgrade; Serbian Biochemical Society*, 143–143.
- Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and Immunity*, 77(11), 5016–5024. <https://doi.org/10.1128/IAI.00585-09>
- Su, S. S., Lae, K. Z. W., & Ngwe, H. (2018). Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical samples. *University of Yangon Research Journal*, 8, 271–275.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M., & Ayala-Zavala, J. F. (2017). Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control*, 75, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.014>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 134, p. 103580). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., & Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *Journal of*

- Bacteriology*, 182(22), 6482–6489. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6482-6489.2000>
- Tomić, T., Henman, M., Tadić, I., Antić Stanković, J., Santrić Milicević, M., Maksimović, N., & Odalović, M. (2023). Antimicrobial utilization and resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using segmented regression analysis: a comparative study between Serbia and eight European Countries. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 45(4), 989–998. <https://doi.org/10.1007/s11096-023-01603-y>
- Trifan, A., Aprotosoai, A. C., Brebu, M., Cioancă, O., Gille, E., Hăncianu, M., & Miron, A. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from Romanian *Satureja montana* L. *Farmacia*, 6(3), 413–416.
- Tucker, A. O., & Maciarello, M. J. (1990). Essential oils of cultivars of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 2(3), 139–144. <https://doi.org/10.1080/10412905.1990.9697844>
- Usman, A. L., Olanrewaju, I. R., Zubair, M. F., Saliu, B., Olawore, O. N., & Elelu, N. (2013). Comparative studies of constituents and antibacterial activities of leaf and fruit essential oils of *Ocimum basilicum* grown in north central Nigeria. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 3, 47–52. [https://unilorin.edu.ng/publications/zubairmf/2013_IJCBS_3-47-52_Usman et al_Comparative studies of constituents and Antibacterial Activities of Leaf and Fruit Essenti~1.pdf](https://unilorin.edu.ng/publications/zubairmf/2013_IJCBS_3-47-52_Usman_et_al_Comparative_studies_of_constituents_and_Antibacterial_Activities_of_Leaf_and_Fruit_Essenti~1.pdf)
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Jerez, C. A. (2006). Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. In *Biotechnology Advances*, 24(2), 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.004>
- van Den Dool, H., & Dec. Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11(C), 463–471. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x)
- Van Vuuren, S. F., Suliman, S., & Viljoen, A. M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 440–446. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x>
- Vattem, D. A., Mihalik, K., Crixell, S. H., & McLean, R. J. C. (2007). Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, 78(4), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.009>
- Vazquez, N. M., Moreno, S., & Galván, E. M. (2022). Exposure of multidrug-resistant

- Klebsiella pneumoniae* biofilms to 1,8-cineole leads to bacterial cell death and biomass disruption. *Biofilm*, 4(July). <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100085>
- Veličković, D. T., Ristić, M. S., Karabegović, I. T., Stojičević, S. S., & Lazić, M. L. (2012). The influence of distillation method on the chemical composition of the essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.). *Savremene Tehnologije / Advanced Technologies*, 1(1), 47–51. <http://www.tf.ni.ac.rs/casopis/sveska1/savremene1.php>
- Veličković, D. T., Ristić, M. S., Randelović, N. V., & Smelcerović, A. A. (2002). Chemical composition and antimicrobial characteristic of the essential oils obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. originating from southeast Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 14(6), 453–458. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699919>
- Velickovic, D. T., Ristic, M. S., Randjelovic, N. V., & Smelcerovic, A. A. (2002). Chemical composition and antimicrobial characteristic of the essential oils obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. Originating from southeast Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 14(6), 453–458. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699919>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(59), 1–29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Vidić, D., Maksimović, M., Čavar, S., & Šolić, M. E. (2009). Comparison of essential oil profiles of *Satureja montana* L. and endemic *Satureja visianii* Šilic. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(3), 273–281. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643720>
- Vijayakumar, K., Manigandan, V., Jeyapragash, D., Bharathidasan, V., Anandharaj, B., & Sathya, M. (2020). Eucalyptol inhibits biofilm formation of *Streptococcus pyogenes* and its mediated virulence factors. *Journal of Medical Microbiology*, 69(11), 1308–1318. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001253>
- Vitanza, L., Maccelli, A., Marazzato, M., Scazzocchio, F., Comanducci, A., Fornarini, S., Crestoni, M. E., Filippi, A., Frascetti, C., Rinaldi, F., Aleandri, M., Goldoni, P., Conte, M. P., Ammendolia, M. G., & Longhi, C. (2019). *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microbial Pathogenesis*, 126, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.025>
- Vraneš, J., & Leskovar, V. (2009). Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Medicinski Glasnik*, 6(2), 147–165.
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., Tiracchia, V., Salvia, A., & Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1003–

1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>
- Vuotto, Claudia, Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., & Varaldo, P. E. (2014). Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. In *Pathogens* 3(3), 743–758). <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>
- Warren, J. W. (2001). Catheter-associated urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(4), 299–303. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00359-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00359-9)
- Wesolowska, A., Kosecka, D., & Jadczyk, D. (2012). Essential oil composition of three sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivaris. *Herba Polonica*, 58(2), 1–16.
- Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., & Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860–864. <https://doi.org/10.1038/35101627>
- Wijesinghe, G. K., Feiria, S. B., Maia, F. C., Oliveira, T. R., Joia, F., Barbosa, J. P., Boni, G. C., & Höfling, J. F. (2021). In-vitro antibacterial and antibiofilm activity of *Cinnamomum verum* leaf oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 93(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201507>
- Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Pathogenesis*, 117, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.026>
- Woods, D. E., Straus, D. C., Johanson, W. G., Berry, V. K., & Bass, J. A. (1980). Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 29(3), 1146–1151. <https://doi.org/0019-9567/80/09>
- Wu, M. C., Lin, T. L., Hsieh, P. F., Yang, H. C., & Wang, J. T. (2011). Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PLoS ONE*, 6(8), e23500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023500>
- Yang, P., Liu, C., Wu, Z., Zheng, J., Yi, J., Wu, N., Wu, Z., Lu, M., Cui, L., & Shen, N. (2022). Clinical outcomes, microbiological characteristics and risk factors for difficult-to-treat resistance to *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Infection and Drug Resistance*, 15, 5959–5969. <https://doi.org/10.2147/IDR.S377064>
- Yang, R., Guan, Y., Zhou, J., Sun, B., Wang, Z., Chen, H., He, Z., & Jia, A. (2018). Phytochemicals from *Camellia nitidissima* Chi flowers reduce the pyocyanin production and motility of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Frontiers in Microbiology*, 8(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02640>

- Yang, Z., Zhou, R., Chen, Y., Zhang, X., Liu, L., Luo, M., Chen, J., Chen, K., Zeng, T., Liu, B., Wu, Y., Huang, J., Liu, Z., & Ouyang, J. (2023). Clinical and molecular characteristics and antibacterial strategies of *Klebsiella pneumoniae* in pyogenic Infection. *Microbiology Spectrum*, 11(4), 1–13. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00640-23>
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8(1), 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>
- Ye, Z., Ye, L., Li, D., Lin, S., Deng, W., Zhang, L., Liang, J., Li, J., Wei, Q., & Wang, K. (2022). Effects of daphnetin on biofilm formation and motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(November), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1033540>
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., & Puglisi, J. D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO Journal*, 17(22), 6437–6448. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6437>
- Yu, Z., Tang, J., Khare, T., & Kumar, V. (2020). The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? In *Fitoterapia* (Vol. 140, p. 104433). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104433>
- Zahin, M., Hasan, S., Aqil, F., Khan, M. S. A., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2010). Screening of certain medicinal plants from India for their anti-quorum sensing activity. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(12), 1219–1224.
- Zeb, A., Ullah, I., Rehman, H., Rehman, M., Jadoon, M. A., Ullah, I., Alam, I., Ullah, R., Iqbal, Z., Hameed, M. F., & Haya, A. (2017). Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in tertiary care hospital. *Entomology and Zoology Studies*, 5(1), 437–439. https://www.researchgate.net/publication/313477048_Antibiotic_susceptibility_Patterns_of_Pseudomonas_aeruginosa_in_tertiary_care_hospital
- Zhang, L., Fritsch, M., Hammond, L., Landreville, R., Slatculescu, C., Colavita, A., & Mah, T. F. (2013). Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *PLoS ONE*, 8(4), 2–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061625>
- Zheng, J. X., Lin, Z. W., Chen, C., Chen, Z., Lin, F. J., Wu, Y., Yang, S. Y., Sun, X., Yao, W. M., Li, D. Y., Yu, Z. J., Jin, J. L., Qu, D., & Deng, Q. W. (2018). Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00021>
- Zhou, J., Bi, S., Chen, H., Chen, T., Yang, R., Li, M., Fu, Y., & Jia, A. Q. (2017). Anti-biofilm

and antivirulence activities of metabolites from *Plectosphaerella cucumerina* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00769>

Zhou, L., Zheng, H., Tang, Y., Yu, W., & Gong, Q. (2013). Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology Letters*, 35(4), 631–637. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1126-x>

Zodrow, K. R., Schiffman, J. D., & Elimelech, M. (2012). Biodegradable polymer (PLGA) coatings featuring cinnamaldehyde and carvacrol mitigate biofilm formation. *Langmuir*, 28(39), 13993–13999. <https://doi.org/10.1021/la303286v>

7. ПРИЛОЗИ

Извод

Повећана и неконтролисана употреба постојећих антибиотика довела је до појаве мултирезистентних сојева, што представља један од водећих проблема данашњице. Са друге стране, продукција фактора вируленције омогућује патогену да се одупре имуном систему домаћина и избегне деловање антимикуробних лекова, што доприноси повећању резистенције. На резистенцију сојева додатно утиче и способност формирања биофилма, с обзиром на познату чињеницу да су бактерије унутар биофилма 10-1000 пута резистентније на деловање антимикуробних лекова него планктонске ћелије. *Pseudomonas aeruginosa* и врсте рода *Klebsiella* sp. представљају најчешће патогене сојеве који се одликују повећаном резистенцијом и водећи су узрочници хроничних инфекција због своје способности да продукују биофилм. Због тога је неопходно пронаћи антимикуробне супстанце које би смањиле резистенцију сојева и повећале активност познатих антибиотика.

Циљеви овог истраживања били су одређивање хемијског састава комерцијалних етарских уља босиљка, жалфије и ртањског чаја, утврђивање њихове антимикуробне и антивирулентне способности, као и њихове способности да повећају активност антибиотика ципрофлоксацина, на патогене клиничке изолате *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella* sp.

Хемијска анализа уља показала је високу заступљеност класе монотерпена код сва три уља. Такође је уочена висока концентрација компоненти α -тујон, камфор, линалол, (*E*)-анетол, тимол и *p*-цимен, чија је антимикуробна активност позната.

Уља босиљка и жалфије су показала антимикуробну активност у опсегу 5-20 mg/ml, док се опсег активности за уље ртањског чаја кретао од 0,63 до 10 mg/ml након примене на изолате *P. aeruginosa*. Када су изолати *Klebsiella* spp. третирани наведеним уљима уочен је опсег активности од 2,5-10 mg/ml за уље босиљка, 1,25-5 mg/ml за уље ртањског чаја, док је уље жалфије било активно само у концентрацијама већим од 20 mg/ml.

Како би се показао утицај уља на продукцију биофилма, уља су примењена у различитим фазама формирања биофилма. Након примене уља на изолате *P. aeruginosa* у самом старту инкубације уочен је опсег инхибиције биофилма 81,4-99,9% за уље

босиљка, уље жалфије показало је опсег инхибиције 84,1-99,6%, а уље ртањског чаја 5,6-93,6. Након примене уља босиљка на изолате *Klebsiella* spp. опсег инхибиције биофилма био је нешто нижи 31,8-89,9%, а уље ртањског чаја довело је до инхибиције биофилма у опсегу од 14,8% до 72,2%.

Када су уља примењена на адхериране ћелије проценат редукције биофилма био је знатно нижи. Уље босиљка инхибирало је биофилм *P. aeruginosa* у опсегу 46,4-96,3%, уље жалфије (0,4-95,7%) а уље ртањског чаја до 48,88%. Уља босиљка и ртањског чаја су показала значајно нижу активност у овој фази формирања биофилма на изолате *Klebsiella* spp. и довела до редукције биофилма 28,8-64,7% (босиљак), а уље ртањског чаја је инхибирало биофилм само код 3 изолата.

Редукција зрелог биофилма изолата *P. aeruginosa* кретала се у опсегу од 74,7 до 99,9% за уље босиљка, 81,3-98,4% за уље жалфије и 23,4-88,5% за уље ртањског чаја. Када су примењена на изолате *Klebsiella* spp. уочена је редукција до 93,2% након третмана уљем босиљка, и до 71,5% након третмана уљем ртањског чаја.

Уља босиљка и жалфије показала су и значајну активност у редукцији покрета код изолата *P. aeruginosa*. Уље босиљка редуковало је покрете код 86,8% тестираних изолата и редуковало покрете до 95,8%. Уље жалфије редуковало је покрете до 97%, док уље ртањског чаја није показало редукцију покрета. Уље босиљка смањило је продукцију пиоцијанина од 13,3-76,34%, а уље жалфије до 74,48%. Уље ртањског чаја показало је нешто слабију активност, редукујући продукцију пиоцијанина од 9,1 до 54,4%.

Након примене уља у комбинацији са ципрофлоксацином код изолата *P. aeruginosa* комбинација босиљак/ципрофлоксацин остварила је синергистички потенцијал код 64,28% тестираних изолата, адитивни уочен код два, а индиферентни ефекат код 3 изолата. Са друге стране, комбинација жалфија/ципрофлоксацин показала је синергистички ефекат код 42,86%, а адитивни код 28,57% тестираних изолата, док је уље ртањског чаја у комбинацији са ципрофлоксацином показало је синергистичку реакцију код 57,14% изолата, а адитивни и индиферентни ефекат код 3 изолата. Код изолата *Klebsiella* spp. синергистички потенцијал уочен је код 66,66% тестираних изолата, а адитивни ефекат уочен код два изолата након третмана комбинацијом босиљак/ципрофлоксацин. Са друге стране, ртањски чај и ципрофлоксацин показали су синергистички ефекат код 77,77% тестираних изолата, а адитивни ефекат уочен је код два изолата.

Summary

The increased and uncontrolled use of antibiotics has led to the emergence of multidrug-resistant strains, which is one of the leading problems today. On the other hand, the production of virulence factors enables pathogen to resist the host immune system and evade the action of antimicrobial drugs, which contributes to increased resistance. The resistance of the strains is additionally affected by the biofilm-forming ability, considering the well-known fact that the bacteria within biofilms are 10-1000 times more resistant to the action of antimicrobial drugs than planktonic cells. *Pseudomonas aeruginosa* and species of the genus *Klebsiella* sp. represent the most common pathogenic strains characterized by increased resistance and are the leading causes of chronic infections due to their ability to produce biofilm. Therefore, it is necessary to find antimicrobial compounds that would reduce the resistance of strains and increase the activity of known antibiotics.

The aims of this research were to determine the chemical composition of commercial essential oils of basil, sage and winter savory, to establish their antimicrobial and antiviral abilities, as well as their abilities to increase the activity of the antibiotic ciprofloxacin against pathogenic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* sp.

Chemical analysis of the oils showed a high prevalence of the monoterpene class in all three oils. A high concentration of the components α -thujone, camphor, linalool, (E)-anethole, thymol and *p*-cymene, whose antimicrobial activity is well known, was also observed.

Basil and sage oils showed antimicrobial activity in the range of 5-20 mg/ml, while the range of activity for tea tree oil ranged from 0.63 to 10 mg/ml after application to *P. aeruginosa* isolates. When isolates of *Klebsiella* spp. were treated with the mentioned oils, an activity range of 2.5-10 mg/ml was observed for basil oil, 1.25-5 mg/ml for winter savory oil, while sage oil was active only in concentrations higher than 20 mg/ml.

To demonstrate the impact of oils on biofilm production, the oils were applied at different stages of biofilm formation. Following the application of oils to *P. aeruginosa* isolates at the start of incubation, the biofilm inhibition range of 81.4-99.9% was observed for basil oil, sage oil showed an inhibition range of 84.1-99.6%, and winter savory oil 5.6-93.6%. After the application of basil oil to *Klebsiella* spp. isolates, the range of biofilm inhibition was slightly lower at 31.8-89.9%, while winter savory oil led to biofilm inhibition ranging from 14.8% to 72.2%.

When the oils were applied to the adhered cells, the percentage of biofilm reduction has been significantly lower. The basil oil inhibited *P. aeruginosa* biofilm in the range of 46.4-

96.3%, sage oil inhibited from 0.4-95.7% and winter savory oil up to 48.88%. Basil and winter savory oils showed significantly lower activity in this stage of biofilm formation on *Klebsiella* spp. isolates and led to biofilm reduction from 28.8-64.7% (basil), while winter savory oil inhibited biofilm only in 3 isolates.

The reduction of mature biofilm of *P. aeruginosa* isolates ranged from 74.7 to 99.9% for basil oil, 81.3-98.4% for sage oil and 23.4-88.5% for winter savory oil. When applied to *Klebsiella* spp. isolates, a reduction of up to 93.2% was observed after treatment with basil oil, and up to 71.5% after treatment with winter savory oil.

Basil and sage oils also showed significant activity in reducing the motility of *P. aeruginosa* isolates. Basil oil reduced motility in 86.8% of the tested isolates and reduced movements by up to 95.8%. Sage oil reduced movements by up to 97%, while winter savory oil did not show a reduction in motility. Basil oil reduced pyocyanin production by 13.3-76.34%, while sage oil reduced it by up to 74.48%. Winter savory oil exhibited slightly weaker activity, reducing pyocyanin production by 9.1 to 54.4%

After the application of oil in combination with ciprofloxacin in *P. aeruginosa* isolates, the basil/ciprofloxacin combination achieved a synergistic potential in 64.28% of the tested isolates, an additive effect was observed in two, and an indifferent effect in 3 isolates. On the other hand, the sage/ciprofloxacin combination showed a synergistic effect in 42.86%, and an additive effect in 28.57% of the tested isolates, while the winter savory oil in combination with ciprofloxacin exhibited a synergistic reaction in 57.14% of the isolates, with an additive and indifferent effect in 3 isolates. For *Klebsiella* spp. isolates, a synergistic potential was observed in 66.66% of the tested isolates, and an additive effect was observed in two isolates after treatment with the basil/ciprofloxacin combination. On the other hand, winter savory and ciprofloxacin showed a synergistic effect in 77.77% of tested isolates, and an additive effect was observed in two isolates.

Биографија

Милица Пејчић Пејић, рођена је 1991. године у Лесковцу. Завршила је основну школу „Станимир Вељковић Зеле“ у Бојнику и друштвено-језички смер Гимназије у Лесковцу 2010. године. Основне студије биологије на Биолошком факултету, Универзитета у Београду завршила 2014. године са просечном оценом 8,83 и стекла звање Дипломирани биолог. Мастер студије завршила 2015. године са просечном оценом 9,64 и стекла звање Мастер професор биологије. Докторске академске студије уписала 2015. године у лабораторији за Микробиологију, на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу. Изабрана у звање истраживач приправник 08.07.2020. године. Ангажована за извођење вежби из предмета „Методологија научно-истраживачког рада“ школске 2020/2021.

Током основних и мастер студија активно учествовала у раду териолошке секције, биолошког истраживачког друштва „Јосиф Панчић“. 2014. године ангажована као стручни водич за групне посете у ботаничкој башти „Јевремовац“ у Београду. У периоду од 2015-2016. године обављала приправнички стаж у средњој техничкој школи „Бошко Крстић“ у Бојнику. У периоду од 2016-2018. године ангажована на радном месту наставник биологије у основној школи „Станимир Вељковић-Зеле“ у Бојнику. Новембра 2019. године положила испит за лиценцу Министарства просвете, науке и технолошког развоја и стекла право да самостално обавља образовно-васпитни рад у оквиру своје струке. Ангажована као Стручни сарадник за микробиологију на летњим и вежбовним семинарима биологије 2017., 2018. и 2019. у Истраживачкој станици Петница.

Похађала програм Треће петничке школе молекуларне биологије- PCR у биолошким и биомедицинским истраживањима, одржаној у Истраживачкој станици Петница 2018. године. Учесник Програма обуке наставника за реализацију наставе оријентисане ка исходима учења (Завод за унапређивање образовања и васпитања, број решења 153-02-00027/2017-07 25.12.2017). Добитник награде за надарене студенте општине Бојник током 2016., 2017. и 2018.

Библиографија

M₂₁ – Радови објављени у врхунским међународним часописима

- Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Joković, N., Jokanović, M., Ivić, M., Šojić, B., Mihajilov-Krstev, T. Inhibition of *Salmonella Enteritidis* growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination. Food Control. 2018. 90, 332-343.
- **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Genčić, M., Dimitrijević, M., Radulović, N. Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Food and Chemical Toxicology. 2020. 141. DOI. 10.1016/j.fct.2020.111431.
- Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Genčić, M., **Pejčić, M.**, Radulović, N. Anticandidal activity of *Inula helenium* root essential oil: Synergistic potential, anti-virulence efficacy and mechanism of action. Industrial Crops and Products, 149, 2020. 112373.

M₂₂ – Радови објављени у истакнутим међународним часописима

- Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Dimitrijević, M., Aleksić, A., V. Anil Kumar, N., Salehi, B., C. Cho, W., Sharifi-Rad, J. Piperine-A Major Principle of Black Pepper: A Review of Its Bioactivity and Studies. Applied Science. 2019. 9, 4270.
- Milenković, A., Stanojević, J., Troter, D., **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Cvetković, D., Stanojević, Lj. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils isolated from black (*Piper nigrum* L.) and cubeb pepper (*Piper cubeba* L.) fruits from the Serbian market, Journal of Essential Oil Research, 2023. 35:3, 262-273, DOI: 10.1080/10412905.2023.2185310.

M₂₃ – Радови објављени у међународним часописима

- Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Stojanović, N., Sharifi-Rad, J., Stanković, N. Potential of *Ocimum basilicum* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against biofilms of *P. aeruginosa* clinical isolates. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France). 2016. 62(9): 27- 33.
- Milenković, A., Stanojević, J., Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Cvetković, D., Zvezdanović, J., Stanojević, Lj. Chemical composition, antioxidative and antimicrobial activity

of allspice (*Pimenta Doica* (L.) Merr.) essential oil and extract, *Advanced technologies*, 2020. 9 (1) 27- 36. DOI: 10.5937/savteh2001027. M24

M₅₂ – Радови објављени у часописима истакнутог националног значаја

- Stanisavljević, J. D., **Pejčić, M.**, G., Stanisavljević, Lj. Ž. The Application of Context-Based Teaching in the Realization of the Program Content “The Decline of Pollinators”. *Journal of Subject Didactics*, 2016. 1(1): 51-53. ID274014.
- **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Radulović, N. Antimicrobial efficacy of basil and sage essential oils against *Pseudomonas aeruginosa*: time-lapse kinetics and type of interaction with ciprofloxacin. *Biologica Nyssana*, 2021. 12 (1), 47-54. DOI: 10.5281/zenodo.5522995.

M₅₃ – Радови објављени у часописима националног значаја

- Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Stanković, N., Aleksić, A., **Pejčić, M.** Frequency of isolation and antibiotic resistance patterns of bacterial isolates from wound infections. *BiologicaNyssana*, 2016. 7(2), 151-15.
- Stanković, N., Joković, N., Mihajilov- Krstev, T., **Pejčić, M.**, Dimitrijević, M. Frequency and antibiotic resistance of bacteria in urinary tract infections in south Serbia. *BiologicaNyssana*, 2017. 8 (2), December 2017: 137-144.

M₃₄ – Радови саопштени на међународним скуповима објављени у изводу

- **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Stojanović N, Stanković N, Radulović N, Antibiofilm potential of *Ocimum basilicum* and *Salvia officinalis* commercial essential oils. Book of abstracts, 12th Symposium on the flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, 16–19th of June, 2016, pp. 89 – 90.
- Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Ničić, S., Ristić, J., Mihajilov -Krstev, T. Efficacy of *Ocimum basilicum* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils against the growth of *Salmonella enterica* subsp. enteritidis in meat., Book of abstracts, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, 16–19th of June, 2016 pp. 123 – 123.
- Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Dimitrijević, M., Stanković, N., Genčić, M., Radulović, N. Inhibitory effects of *Ocimum basilicum* and *Salvia officinalis* essential oils on virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Book of abstracts, Facta

Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology, 16(1), 82. Special Issue, 49th International Symposium on Essential Oils (ISEO 2018).

- Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., **Pejčić, M.**, Stanković, N., Genčić, M., Živković, M., & Radulović, N. Anticandidal activity of *Inula helenium* root essential oil: synergistic potential, anti-virulence efficacy, and mechanism of action. Book of abstracts, Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology, 16(1), 82. Special Issue, 49th International Symposium on Essential Oils (ISEO 2018).
- **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Stojković, O. Effects of *Satureja montana* L. essential oil against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates: anti-virulence and synergistic potential, Book of abstracts, 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara mountain, 20–23th of June, 2019 pp. 145 – 145.
- **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Janković, A. Antipseudomonal activity of *Satureja montana* L. essential oil and its synergistic potential with ciprofloxacin, Book of abstracts, 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara mountain, 20–23th of June, 2019 pp. 154-154.
- Milenković, A., Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Stanojević, Lj., Stanojević, J. Chemical composition and antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum* L.), cubeb (*Piper cubeba* L.) and allspice (*Pimenta dioica* (L.) Merr) essential oils. Book of abstracts, 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara mountain, 20–23th of June, 2019 pp. 136 – 136.
- Dimitrijević, M., Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Dinčev, S. Anticandidal activity of *Satureja montana* and *Thymus vulgaris* essential oils: synergistic potential and anti-virulence efficacy. Book of abstracts, 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara mountain, 20–23th of June, 2019 pp. 139 – 139.
- Milenković, A., **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Petrović, S., Zvezdanović, J., Stanojević, J., Stanojević, Lj. Cubeb pepper (*Piper cubeba* L.) extracts as a source of natural antioxidants, antimicrobial agents and minerals, Book of Abstracts, p.51., VII International Congress Engineering, Environment and Materials in Process Industry – EEM2021, Jahorina, March 17-19, 2021. Republic of Srpska, Bosnia and Hercegovina. <https://eem.tfzv.ues.rs.ba/>, ISBN: 978-99955-81-38-1.
- Dimitrijević, M., Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Nešić, M., Radulović, N. Antimicrobial and synergistic effects and chemical composition of the selected essential oils

on clinical isolates of the genus *Candida*. Book of abstracts, 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Кладово, 26–29th of June, 2022 pp. 183.

- **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M. Time lapse kinetics of sage and winter savory essential oils and combined oils effects against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Book of abstracts, 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Кладово, 26–29th of June, 2022 pp. 184.
- Milenković, A., Stanojević, Lj., Stanojević, J., Nikolić, V., **Pejčić, M.**, Stojanović Radić, Z., Nikolić, G. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Oleoresin, Proceedings Book, p. 560, 3rd International Symposium of Scientific Research and Innovative Studies, ISSRIS'23, 15-18 March 2023, ISBN: 978-605-73639-6-1.

M₆₄ – Радови саопштени на скуповима националног значаја објављени у изводу

- **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Stanković, N., Mihajlov-Krstev, T. Antimikrobna efikasnost i mehanizmi antimikrobnog delovanja etarskih ulja eukaliptusa i čajevca na humane respiratorne izolate. Knjiga sažetaka, Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, 25-30 septembar, 2018, p. 249.
- Dimitrijević, M., Stojanović-Radić, Z., **Pejčić, M.**, Stanković, N., Joković, N., Mihajlov-Krstev, T.: Antimikrobna aktivnost i mehanizmi delovanja etarskog ulja omana (*Inula helenium*) na humane respiratorne izolate. Knjiga sažetaka. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, 25-30 septembar, 2018, p. 250.
- **Pejčić, M.**, Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M. Evaluation of antibiofilm activity of selected commercial essential oils. 13th Symposium with international participation “Novel technologies and economic development” Faculty of Technology, Leskovac, Serbia, October, 18-19, 2019.
- **Pejčić, M.**, Stojanović Radić, Z., Stojković, O. The time-lapse activity of comercial basil essential oil against *Klebsiella* spp. clinical islates and type of interaction with the antibiotic ciprofloxacin. 14th Symposium with international participation “Novel technologies and economic development” Faculty of Technology, Leskovac, Serbia, October, 22-23, 2021.

Изјаве аутора

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Антимикробна активност комерцијалних етарских уља одабраних биљних врста породице Lamiaceae на клиничке изолате *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella* spp.: антивирулентни и синергистички потенцијал

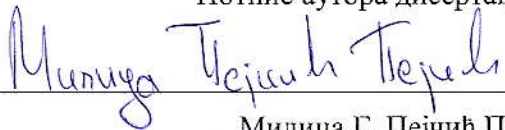
која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 14.5.2024

Потпис аутора дисертације:



Милица Г. Пејчић Пејић

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

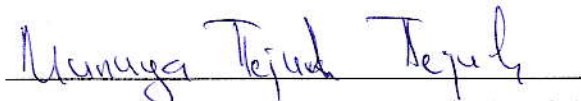
Наслов дисертације

**Антимикробна активност комерцијалних етарских уља одабраних
биљних врста породице Lamiaceae на клиничке изолате *Pseudomonas
aeruginosa* и *Klebsiella* spp.: антивирулентни и синергистички
потенцијал**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам
предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан
штампаном облику.

У Нишу, 14.5.2024

Потпис аутора дисертације:



Милица Г. Пејчић Пејић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Антимикробна активност комерцијалних етарских уља одабраних биљних врста породице *Lamiaceae* на клиничке изолате *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella spp.*: антивирулентни и синергистички потенцијал

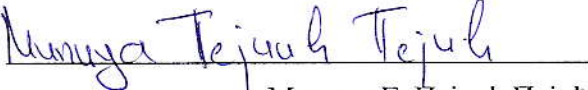
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 14. 5. 2024

Потпис аутора дисертације:


Милица Г. Пејчић Пејић