

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА  
„СИНИША СТАНКОВИЋ“  
Институт од националног значаја за Републику Србију  
Универзитет у Београду  
Бул. деспота Стефана 142  
Директор: +381-11-2078-399  
Тел: +381-11-2078-300  
Факс: +381-11-2761-433  
[www.ibiss.bg.ac.rs](http://www.ibiss.bg.ac.rs)



Број / № 01-674/2

INSTITUTE FOR BIOLOGICAL RESEARCH  
“SINIŠA STANKOVIĆ”  
National Institute of Republic of Serbia  
University of Belgrade  
Bul. despota Stefana 142  
Director: +381-11-2078-399  
Tel: +381-11-2078-300  
Fax: +381-11-2761-433  
[www.ibiss.bg.ac.rs](http://www.ibiss.bg.ac.rs)

Датум / Date 18.04.2022.

## IZVEŠTAJ О ISPITIVANJU ANTIBAKTERIJSKE, ANTIFUNGALNE I ANTIBIOFILM AKTIVNOSTI PREPARATA „Ulje divljeg origana“

Probotanic d.o.o.

18.04.2022., Beograd

Vučićev prolaz 20a

Beograd

Predmet: Odgovor na dopis od 17.11.2021. god.

Preduzeće Probotanic d.o.o. obratilo se Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu (u daljem tekstu IBISS) za stručno mišljenje o potencijalnom antimikrobnom (antibakterijskom, antifungalnom i antibiofilm) dejstvu proizvoda „**Ulje divljeg origana**“.

Na osnovu pregleda dostavljene dokumentacije od strane podnosioca zahteva, kao i pregleda literature i odrađenih laboratorijskih analiza donosimo sledeće:

## STRUČNO MIŠLJENJE

Antimikrobnja aktivnost preparata „Ulje divljeg origana” je testirana na ukupno 26 sojeva bakterija i 11 sojeva mikrogljiva (filamentozne i kvasolike gljive) i poređena sa aktivnošću komercijalnih antibiotika/antimikotika. Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti komercijalnog preparata i antibiotika korišćene su sledeće vrste bakterija: *Bacillus cereus* (klinički izolat), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *E. faecalis* (IBR E001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *S. aureus* (oralni izolat), meticilin rezistentna *S. aureus* (IBRS MRSA 011), *Staphylococcus epidermidis* (IBIS 2999), *Staphylococcus lugdunensis* (IBIS 2996), *Streptococcus sanguinis* (IBR S002), *Streptococcus salivarius* (IBR S006), *Streptococcus pyogenes* (IBR S003), *Streptococcus mutans* (IBR S001), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Lactobacillus acidophilus* (IBRS L001), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *P. aeruginosa* PaO1, *P. aeruginosa* (IBRS P001), *Enterobacter cloacae* (klinički izolat), *Escherichia coli* (ATCC 35210), *E. coli* (IBRS E003), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311) i *Serratia marcescens*.

Istraživanje antifungalne aktivnosti preparata „Ulje divljeg origana” vršeno je na 7 filamentoznih gljiva: *Aspergillus fumigatus* (humani izolat), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium crustosum* (IBRS Pc002), *Trichoderma viride* (IAM 5061), i 4 vrste kvasolikih gljiva *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (H1/16), *Candida auris* (ATCC B 11903) i *Candida parapsilosis* (ATCC 22109).

Antibiotici, „PANCEF” (iz grupe cefalosporina) i „PANKLAV” (iz grupe penicilina) su korišćeni kao pozitivne kontrole pri testiranju antibakterijske aktivnosti, dok su u slučaju ispitivanja antifungalne aktivnosti za pozitivnu kontrolu korišćeni sledeći komercijalni antimikotici: „KETOKONAZOL” (iz grupe azola) i „NISTATIN” (iz grupe poliena). Antimikrobnja aktivnost određena je *in vitro* mikrodilucionom metodom (CLSI, 2009). Najniža koncentracija na kojoj nije bilo vidljivog rasta je definisana kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Potvrda odsustva rasta mikroorganizama, tj. određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK) i minimalne fungicidne koncentracije (MFK), rađena je

serijskom reinokulacijom sa mesta gde je bilo vidno da nema rasta mikroorganizama u sterilne hranljive podloge, nakon inkubacije na 37°C, 24 h (bakterije) odnosno 28°C, 72 h (mikrogljive).

Ispitivanje antibiofilm aktivnosti je vršeno određivanjem minimalne biofilm inhibitorne koncentracije (MBIK) i minimalne biofilm eradikacione koncentracije (MBEK), što odgovara koncentracijama agenasa koje za više od 50% inhibiraju formiranje (MBIK) ili uklanjaju već formirani 24 sata star biofilm mikroorganizama (MBEK) (Ivanov i sar., 2022). Korišćena je metoda bojenja kristal violetom u mikrotitar pločama. Kao model fungalgog biofilma ispitivana je osetljivost *C. albicans* (ATCC 10231), dok je za bakterijski biofilm korišćen *P. aeruginosa* (PaO1).

Svi testirani sojevi su deponovani u Mikoteci Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

### **ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST PREPARATA „Ulje divljeg origana”**

Utvrđeno je da je preparat „**Ulje divljeg origana**” delovao bakteriostatski i baktericidno, odnosno inhibirao je rast ali i onemogućio dalji rast svih ispitivanih Gram (-) i Gram (+) bakterija. Najosetljivije bakterijske vrste na ispitivani proizvod su *Bacillus cereus* i *Enterococcus faecalis* sa minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIK) od 0.283 mg/mL i baktericidnim koncentracijama (MBK) od 0.570 mg/mL. Najotpornije bakterije na dejstvo ispitivanog preparata su *Yersinia enterocolitica* i *Klebsiella pneumoniae* sa inhibitornim/baktericidnim koncentracijama od 5.706/11.411 mg/mL (Tabela 1.).

Dejstvo testiranih antibiotika prikazano je u Tabeli 1. „PANCEF” je pokazao bakteriostatsku aktivnost u opsegu 0.0004 – 0.238 mg/mL, i baktericidnu aktivnost u opsegu od 0.0008 – 0.477 mg/mL. Dok su za „PANKLAV” testirani MIK vrednosti iznosile 0.0002 – 0.378 mg/mL, a MBK su bile u opsegu 0.0008 – 0.504 mg/mL. Testirani preparat „**Ulje divljeg origana**” je pokazao slabiju aktivnost u odnosu na testirane antibiotike (Tabela 1.).

## **ANTIFUNGALNA AKTIVNOSTI PREPARATA „Ulje divljeg origana”**

Utvrđeno je da je preparat „**Ulje divljeg origana**” delovao fungistatski i fungicidno, odnosno inhibirao je rast, ali i onemogućio dalji rast svih ispitivanih mikrogljiva. Najosetljivije vrste na ispitivani proizvod su filamentozna gljiva *Penicillium funiculosum* sa minimalnom inhibitornim koncentracijom (MIK) od 0.04 mg/mL i fungicidnom koncentracijom (MFK) od 0.07 mg/mL i kvasolika vrsta *Candida auris* sa MIK/MFK vrednostima 0.07/0.15 mg/mL. Najotporna gljiva na dejstvo ispitivanog preparata je *Candida albicans* sa inhibitornom/fungicidnom koncentracijom od 1.14 /2.28 mg/mL (Tabela 2.).

Dejstvo testiranih antimikotika prikazano je u Tabeli 2. Inhibitorne vrednosti „**KETOKONAZOL**”-a su u opsegu 0.0018-0.125 mg/mL, a fungicidne u opsegu od 0.0037 - 0.60 mg/mL. Drugi ispitivani antimikotik „**NISTATIN**” inhibirao je rast mikrogljiva u opsegu 0.003 – 0.03 mg/mL, dok je MFK bila u opsegu 0.006 – 0.07 mg/mL.

Testirani preparat „**Ulje divljeg origana**” pokazao je slabiju aktivnost u odnosu na testirane antimikotike (Tabela 2.), izuzimajući vrstu *Aspergillus fumigatus* koja je bila osetljivija na ispitivani preparat koji je skoro pet puta bolje delovao na ovog opasnog humanog oportunog patogena sa MIK/MFK vrednostima 0.07/0.15 mg/mL u poređenju sa komercijalnim antimikotikom „**KETOKONAZOL**” i njegovim MIK/MFK vrednostima 0.30/0.60 mg/mL. Takođe, fungicidna vrednost ispitivanog preparata (MFK) za vrstu *Penicillium crustosum* 0.28 mg/mL, bila je bolja u poređenju sa MFK vrednosti 0.50 mg/mL, antimikotika „**KETOKONAZOL**“.

## **ANTIBIOFILM AKTIVNOST PREPARATA „Ulje divljeg origana”**

Antibiofilm aktivnost preparata „**Ulje divljeg origana**” prikazana je u Tabeli 3. Ulje je ispoljilo znatno bolji efekat na prevenciju nastanka biofilma oba ispitivana mikroorganizma (MBIK 1.82 mg/mL) u odnosu na eradicaciju 24 h starih biofilmova (MBEK 7.30 mg/mL). Kada su u pitanju komercijalni antibiotici „**PANCEF**” i „**PANKLAV**” koncentracija od 0.02 mg/mL

odnosno 0.45 mg/mL utiče na inhibiciju odnosno eradikaciju bakterijskog biofilma. U slučaju dejstva antimikotika „KETOKONAZOL” i „NISTATIN” na biofilm *C. albicans*, efikasne doze su od 4 do 20 mg/mL.

Postoji potreba za stalnim ispitivanjima potencijalnih novih preparata kako bi se pronašle adekvatne zamene za sintetske antimikrobne agense na koje je vremenom razvijena rezistencija ili čak višestruka rezistencija. Pored novih sintetskih lekova neophodna su i ispitivanja različitih supstanci prirodnog porekla u cilju daljeg korišćenja preparata koji imaju što manje štetnih efekata na čoveka.

Na osnovi pregledane literature i odrađenih *in vitro* analiza može se izvesti sledeći **zaključak**.

**Ispitivani proizvod „Ulje divljeg origana” pokazao je dobru antimikrobnu (antibakterijsku i antifungalnu), kao i umerenu antibiofilm aktivnost. Ove laboratorijske *in vitro* analize ukazuju da korišćenje ovog preparata u određenim bezbednim koncentracijama u prevenciji ili kao dodatak tretmanu raznih bakterijskih i gljivičnih infekcija vrsta ispitivanih u ovoj studiji može da ima pozitivno dejstvo na ljudsko zdravlje. Osobine ovog proizvoda kao i činjenica da su trenutni globalni trendovi vraćanja što prirodnijem načinu lečenja jer je pokazana štetnost sintetskih jedinjenja kako na čoveka tako i na ekosistem, ukazuju na značaj preparata „Ulje divljeg origana”.**



Dr Jasmina Glamočlija

Naučni savetnik

Mikološka laboratorija IBISS



Naučni savetnik

Direktor IBISS

**Reference:**

CLSI (2009): Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, CLSI publication M07-A8, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 8th ed.

Ivanov M, Kostić M, Stojković D, Soković M. (2022): Rosmarinic acid–Modes of antimicrobial and antibiofilm activities of common plant polyphenol South African Journal of Botany, 146: 521-527.

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, 7532–7546.

Marković, T., Nikolić, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Emerald, M., Radanović, D., Zheljazkov, V., Soković., M. (2016): Essential oils in prevention and treatment of human opportunistic fungal diseases, Chapter 15 in Book: Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization, Eds. Valtcho D. Jeliažkov (Zheljazkov) and Charles L. Cantrell, American Chemical Society Symposium Series, Vol.1218, 247-277.

**Tabela 1.** Antibakterijska aktivnost preparata „Uje divljeg origana” (mg/mL).

BAKTERIJE (26)	„Uje divljeg origana” (mg/mL)		„PANCEF” (mg/mL)		„PANKLAV” (mg/mL)	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
<i>Bacillus cereus</i> (klinički izolat)	0.283	0.570	0.119	0.238	0.003	0.007
<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 7973)	0.570	1.141	0.238	0.477	0.003	0.007
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	0.570	1.141	0.003	0.006	0.0004	0.0008
<i>E. faecalis</i> (IBR E001)	0.283	0.570	0.0008	0.003	0.0008	0.003
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11632)	0.570	1.141	0.238	0.477	0.0008	0.002
<i>S. aureus</i> (oralni izolat)	0.570	1.141	0.026	0.053	0.0008	0.002
Meticilin rezistentna <i>S. aureus</i> (IBRS MRSA 011)	1.141	2.282	0.059	0.119	0.252	0.504
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (IBIS 2999)	0.570	1.141	0.009	0.013	0.0004	0.0008
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (IBIS 2996)	0.570	1.141	0.003	0.006	0.0002	0.0004
<i>Streptococcus sanguinis</i> (IBR S002)	0.570	1.141	0.003	0.006	0.0008	0.0017
<i>Streptococcus salivarius</i> (IBR S006)	0.570	1.141	0.003	0.006	0.0004	0.0008
<i>Streptococcus pyogenes</i> (IBR S003)	0.570	1.141	0.013	0.026	0.007	0.014
<i>Streptococcus mutans</i> (IBR S001)	1.141	2.282	0.003	0.006	0.0002	0.0004
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	0.570	1.141	0.029	0.059	0.0004	0.0004
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (IBRS L001)	0.712	1.424	/	/	/	/
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 7002)	0.429	0.570	0.0004	0.0008	0.0004	0.0008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0.570	1.141	0.059	0.119	0.028	0.056
<i>P. aeruginosa</i> (PaO1)	1.068	1.424	0.003	0.007	0.378	0.504
<i>P. aeruginosa</i> (IBRS P001)	1.141	2.282	0.0008	0.002	0.021	0.028
<i>Enterobacter cloacae</i> (klinički izolat)	1.141	2.282	0.238	0.477	0.010	0.014
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35210)	1.141	2.282	0.003	0.006	0.010	0.014
<i>Escherichia coli</i> (IBRS E003)	1.141	2.282	0.119	0.238	0.021	0.028
<i>Yersinia enterocolitica</i> (ATCC 23715)	5.706	11.411	0.007	0.014	0.007	0.014
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	5.706	11.411	0.003	0.007	0.021	0.028
<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC 13311)	1.141	2.282	0.238	0.477	0.005	0.007
<i>Serratia marcescens</i>	1.424	2.830	0.0004	0.0008	0.028	0.056

**Tabela 2.** Antifungalna aktivnost preparata „Ulje divljeg origana” (mg/ml).

GLJIVE (11)	„Ulje divljeg origana” (mg/mL)		„KETOKONAZOL” (mg/mL)		„NISTATIN” (mg/mL)	
	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK
<i>Aspergillus fumigatus</i> (humani izolat)	0.07	0.15	0.30	0.60	0.003	0.006
<i>A. flavus</i> (ATCC 9170)	0.07	0.15	0.03	0.07	0.03	0.07
<i>A. niger</i> (ATCC 6275)	0.57	1.14	0.004	0.006	0.006	0.012
<i>Penicillium ochrochloron</i> (ATCC 9112)	0.15	0.28	0.15	0.30	0.003	0.006
<i>P. funiculosum</i> (ATCC 36839)	0.04	0.07	0.03	0.07	0.003	0.006
<i>P. crustosum</i> (IBRS Pe002)	0.15	0.28	0.125	0.50	0.0075	0.015
<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)	0.07	0.15	0.03	0.07	0.006	0.025
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22109)	0.15	0.28	0.0056	0.0075	0.006	0.012
<i>C. auris</i> (ATCC B11903)	0.07	0.15	0.0018	0.0037	0.0185	0.025
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	1.14	2.28	0.05	0.10	0.009	0.012
<i>C. krusei</i> (H1/16)	0.57	1.14	0.011	0.015	0.0045	0.006

Tabela 3. Minimalna biofilm inhibitora (MBIK) i eradiaciona (MBEK) koncentracija preparata „Ulije divljeg origana” (mg/mL).

	„Ulije divljeg origana” (mg/mL)		„PANCEF” (mg/mL)		„PANKLAV” (mg/mL)		„KETOKONAZOL” (mg/mL)		„NISTATIN” (mg/mL)	
	MBIK	MBEK	MBIK	MBEK	MBIK	MBEK	MBIK	MBEK	MBIK	MBEK
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	1.82	7.30	-	-	-	-	20	20	4	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PaO1)	1.82	7.30	0.02	0.02	0.45	0.45	-	-	-	-