

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА  
„СИНИША СТАНКОВИЋ“  
Институт од националног значаја за Републику Србију  
Универзитет у Београду  
Бул. деспота Стефана 142  
Директор: 011-2078-399  
Тел: 011-2078-300  
Факс: 011-2761-433  
www.ibiss.bg.ac.rs



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

Број / № 01-675/2

Датум / Date 18.04.2022.

## IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI PREPARATA

### "Origano Sept strong"

**Probotanic d.o.o.**

**18.04.2022., Beograd**

**Vučičev 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 "**Origano Sept strong**".

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

## STRUČNO MIŠLJENJE

Antimikrobna (antibakterijska, antifungalna i antibiofilm) aktivnost preparata "**Origano Sept strong**" i antibiotika/antimikotika testirana je na 26 sojeva bakterija i 11 sojeva mikroglijiva (filamentoznih i kvasolikih gljiva). Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti komercijalnog preparata i antibiotika korišćeni su sledeći sojevi 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*.

Ispitivanje antifungalne aktivnosti preparata "**Origano Sept strong**" rađeno je na 7 filamentoznih gljiva: *Aspergillus fumigatus* (klinički 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 kvasolike vrste *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 bili pozitivne kontrole za testiranja 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).

Antibakterijska i antifungalna 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 (gljive).

Antibiofilm aktivnost preparata "**Origano Sept strong**" ispitivana je 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). Korišćena je metoda bojenja kristal violetom u mikrotitar pločama (Ivanov i sar., 2022). Kao model fungalnog biofilma ispitivana je osetljivost *C. albicans* (ATCC 10231), dok je za bakterijski biofilm korišćen *P. aeruginosa* (PaO1).

Svi testirani mikroorganizmi 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.

Pokazano je da je preparat "**Origano Sept strong**" delovao bakteriostatski i baktericidno. Najosetljivija bakterijska vrsta na ispitivani proizvod je *Lactobacillus acidophilus* sa inhibitornom koncentracijom od 83.7 mg/mL i baktericidnom koncentracijom od 111.7 mg/mL. Najotpornije bakterije na dejstvo ispitivanog preparata su *Micrococcus luteus* i *Streptococcus salivarius* sa inhibitornim/baktericidnim koncentracijama od 670.2/893.6 mg/mL (Tabela 1.).

Dejstvo testiranih antibiotika prikazano je u Tabeli 1. „PANCEF“ je pokazao bakteriostatsko dejstvo u opsegu 0.0004-0.238 mg/mL, i baktericidnu aktivnost u opsegu od 0.0008 - 0.477 mg/mL. Sintetski antibiotik „PANKLAV“ imao je MIK vrednosti u opsegu 0.0002 – 0.378 mg/mL, a MBK u opsegu 0.0008 – 0.504 mg/mL.

Testirani preparat "**Origano Sept strong**" pokazao je znatno slabiju aktivnost u odnosu na testirane antibiotike (Tabela 1.).

Utvrđeno je da je preparat "**Origano Sept strong**" delovao fungistatski i fungicidno, odnosno inhibirao je rast, ali i onemogućio dalji rast svih ispitivanih mikrogljiva. Najosetljivije vrste na ispitivani proizvod su filamentozna gljiva *Aspergillus niger* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) od 41.91 mg/mL i fungicidnom koncentracijom (MFK) od 55.9 mg/mL i kvasolika vrsta *Candida parapsilosis* sa MIK/MFK vrednostima 55.9/111.7 mg/mL.

Najotpornija gljiva na dejstvo ispitivanog preparata je *Candida albicans* sa inhibitornom/fungicidnom koncentracijom od 335.1 /446.7 mg/mL (Tabela 2.).

Dejstvo testiranih antimikotika prikazano je u Tabeli 2. Inhibitorne vrednosti za "KETOKONAZOL" 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.

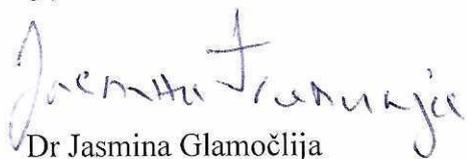
Testirani preparat "**Origano Sept strong**" je pokazao dosta slabiju antifungalnu aktivnost u odnosu na testirane antimikotike (Tabela 2.).

Uticaj preparata "**Origano Sept strong**" na formiranje i eradikaciju biofilmova patogenih mikroorganizama prikazan je u Tabeli 3. Ispitivanjem antibiofilm potencijala preparata "**Origano Sept strong**" utvrđeno je da u koncentraciji od 248.22 mg/mL odnosno 109.22 mg/mL umanjuje sposobnost formiranja biofilmova vrsta *C. albicans* (ATCC 10231) odnosno *P. aeruginosa* (PaO1) za više od 50%. Kada je u pitanju tretman već formiranih 24 h starih biofilmova potrebne su bile nešto veće koncentracije agenasa i to 496.43 mg/mL u slučaju *C. albicans* (ATCC 10231), odnosno 218.43 mg/mL za eradikaciju više od 50% biofilma *P. aeruginosa* (PaO1). Komercijalni antibiotici „PANCEF” i „PANKLAV” su delovali u koncentracijama od 0.02 mg/mL odnosno 0.45 mg/mL uticali su na inhibiciju odnosno eradikaciju bakterijskog biofilma. U slučaju dejstva antimikotika na biofilm *C. albicans*, efikasne doze su bile od 4 do 20 mg/mL. Komercijalni antibiotici i antimikotici su ispoljili izraženiji antibiofilm potencijal u odnosu na "**Origano Sept strong**".

Preparati na bazi biljaka su korišćeni vekovima zbog različitih svojstava, među kojima su i antimikrobna. Ispitivanja potencijalno novih preparata kako bi se pronašle adekvatne zamene za sintetske antibiotike i antimikotike na koje je vremenom razvijena mnogostruka rezistencija su kontinuirana.

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

**Ispitivani proizvod "Origano Sept strong" pokazao je antimikrobnu (antibakterijsku, antifungalnu i antibiofilm) aktivnost. Korišćenje ovog preparata može se smatrati opravdanim, u nedostatku svih ostalih agenasa, u prevenciji raznih bakterijskih i gljivičnih infekcija izazvanih vrstama ispitivanim u okviru gore navedenih analiza.**

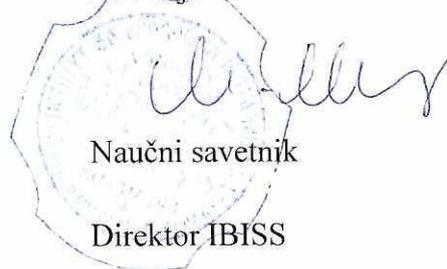


Dr Jasmina Glamočlija

Naučni savetnik

Mikološka laboratorija IBISS

Dr Mirjana Mihailović



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. Jeliaskov (Zheljzakov) and Charles L. Cantrell, American Chemical Society Symposium Series, Vol.1218, 247-277.

**Tabela 1.** Antibakterijska aktivnost proizvoda "Origano Sept strong" (mg/mL).

BAKTERIJE (26)	„Origano Sept strong“ (mg/mL)		„PANCEF“ (mg/mL)		„PANKLAV“ (mg/mL)	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
<i>Bacillus cereus</i> (klinički izolat)	223.4	446.8	0.119	0.238	0.003	0.007
<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 7973)	446.8	893.6	0.238	0.477	0.003	0.007
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	446.8	893.6	0.003	0.006	0.0004	0.0008
<i>E. faecalis</i> (IBR E001)	446.8	893.6	0.0008	0.003	0.0008	0.003
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11632)	446.8	893.6	0.238	0.477	0.0008	0.002
<i>S. aureus</i> (oralni izolat)	446.8	893.6	0.026	0.053	0.0008	0.002
Meticilin rezistentna <i>S. aureus</i> (IBRS MRSA 011)	446.8	893.6	0.059	0.119	0.252	0.504
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (IBIS 2999)	446.8	893.6	0.009	0.013	0.0004	0.0008
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (IBIS 2996)	446.8	893.6	0.003	0.006	0.0002	0.0004
<i>Streptococcus sanguinis</i> (IBR S002)	446.8	893.6	0.003	0.006	0.0008	0.0017
<i>Streptococcus salivarius</i> (IBR S006)	670.2	893.6	0.003	0.006	0.0004	0.0008
<i>Streptococcus pyogenes</i> (IBR S003)	446.8	893.6	0.013	0.026	0.007	0.014
<i>Streptococcus mutans</i> (IBR S001)	446.8	893.6	0.003	0.006	0.0002	0.0004
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	670.2	893.6	0.029	0.059	0.0004	0.0004
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (IBRS L001)	83.7	111.7	/	/	/	/
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 7002)	285.4	446.8	0.0004	0.0008	0.0004	0.0008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	446.8	893.6	0.059	0.119	0.028	0.056
<i>P. aeruginosa</i> (PaO1)	670.2	893.6	0.003	0.007	0.378	0.504
<i>P. aeruginosa</i> IBRS P001	446.8	893.6	0.0008	0.002	0.021	0.028
<i>Enterobacter cloacae</i> klinički izolat	446.8	893.6	0.238	0.477	0.010	0.014
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35210	446.8	893.6	0.003	0.006	0.010	0.014
<i>E. coli</i> (IBRS E003)	446.8	893.6	0.119	0.238	0.021	0.028
<i>Yersinia enterocolitica</i> (ATCC 23715)	446.8	893.6	0.007	0.014	0.007	0.014
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	446.8	893.6	0.003	0.007	0.021	0.028
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 13311)	446.8	893.6	0.238	0.477	0.005	0.007
<i>Serratia marcescens</i>	446.8	893.6	0.0004	0.0008	0.028	0.056

**Tabela 2.** Antifungalna aktivnost preparata "Origano Sept strong" (mg/ml).

GLJIVE (11)	„Origano Sept strong“ (mg/ml)		“KETOKONAZOL” (mg/ml)		“NISTATIN” (mg/ml)	
	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK
<i>Aspergillus fumigatus</i> (klinički izolat)	111.7	223.4	0.30	0.60	0.003	0.006
<i>A. flavus</i> (ATCC 9170)	111.7	223.4	0.03	0.07	0.03	0.07
<i>A. niger</i> (ATCC 6275)	41.91	55.9	0.004	0.006	0.006	0.012
<i>Penicillium ochrochloron</i> (ATCC 9112)	167.55	223.4	0.15	0.30	0.003	0.006
<i>P. funiculosum</i> (ATCC 36839)	55.9	111.7	0.03	0.07	0.003	0.006
<i>P. crustosum</i> (IBRS Pc002)	223.4	446.8	0.125	0.50	0.0075	0.015
<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)	55.9	111.7	0.03	0.07	0.006	0.025
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22109)	55.9	111.7	0.0056	0.0075	0.006	0.012
<i>C. auris</i> (ATCC B 11903)	167.55	223.40	0.0018	0.0037	0.0185	0.025
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	335.1	446.8	0.05	0.10	0.009	0.012
<i>C. krusei</i> (HI/16)	111.7	223.4	0.011	0.015	0.0045	0.006

**Tabela 3.** Minimalna biofilm inhibitorna (MBIK) i eradikaciona (MBEK) koncentracija preparata "Origano Sept strong" (mg/ml).

	"Origano Sept strong" (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>C. albicans</i> (ATCC 10231)	248.22	496.43	-	-	-	-	20	20	4	8
<i>P. aeruginosa</i> (PaO1)	109.22	218.43	0.02	0.02	0.45	0.45	-	-	-	-