



Број / N° 01-647

Датум / Date 17. 03. 2017.

**IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU ANTIBAKTERIJSKE I ANTIFUNGALNE
AKTIVNOSTI PREPARATA " Probotanic Ulje divljeg origana"**

"Baltik Junior"

16.03.2017., Beograd

Vučičev prolaz 20 a

Beograd

Predmet: Odgovor na dopis od 05. 02. 2017. god.

Preduzeće **"Baltik Junior"** obratilo se Institutu za biološka istraživanja **"Siniša Stanković"** u Beogradu (u daljem tekstu IBISS), za stručno mišljenje o potencijalnom antibakterijskom i antifungalnom dejstvu proizvoda **" Probotanic Ulje divljeg origana"**.

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

STRUČNO MIŠLJENJE

Uzorak **" Probotanic Ulje divljeg origana"** ispitavan je na sledeće Gram (+) i Gram (-) bakterije, *Streptococcus pyogenes* (IBRS S003), *Streptococcus salivarius*

(IBRS S006), *Streptococcus sanguinis* (IBRS S002), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 11, *Proteus mirabilis* (klinički izolat), *Pseudomonas aeruginosa* (IBRS P001), *Bacillus cereus* (clinical isolate), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Salmonella enteritidis* (klinički izolat), *Salmonella infantis* (klinički izolat), *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Enterobacter cloacae* (human isolate), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Yersinia enterocolitica* (klinički izolat), *Serratia marcescens* (klinički izolat). Za istraživanje antifungalne aktivnosti *in vitro* korišćena je *Candida albicans* (IBRS MH4), *Candida krusei* (IBRS 1flac1), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus fumigatus* (human isolate), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066) and *Trichoderma viride* (IAM 5061). Svi mikroorganizmi su deponovani u Mikoteci Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu. Za pozitivnu kontrolu korišćeni su sledeći antibiotici: Streptomycin, Ampicilin, Augmentin, Ciproxin i Klaricid, i dva mikotika: Bifonazol i Ketokonazol. Korišćena je *in vitro* mikrodiluciona metoda (Hanela and Raether, 1988; Soković et al., 2010).

Utvrdeno je da je "**Probotanic Ulje divljeg origana**" delovalo bakteriostatski i baktericidno, odnosno inhibirao rast ali i onemogućio dalji rast svih ispitivanih Gram (-) i Gram (+) bakterija. Najosetljivija bakterijska vrsta na ispitivani proizvod je *Micrococcus flavus* sa inhibitornom koncentracijom od 0.01 microg/ml i baktericidnom koncentracijom od 0.015 microg/ml. Najotpornije bakterije na dejstvo ispitivanog preparata su *Enterococcus faecalis* i *Serratia marcescens* sa inhibitornim/baktericidnim koncentracijama od 0.45/0.60 microg/ml. Utvrdeno je da je ovaj preparat delovao na sve ispitivane bakterije u veoma niskim koncentracija, čak i na najotpornije Gram (-) bakterije, među njima *Pseudomonas aeruginosa*, koja važi za jednu od najotpornijih i najrezistentnijih bakterija (Soković et al., 2010).

Streptomycin je pokazao inhibitornu aktivnost u velikom rasponu zavisno od vrste bakterija, od 1.5-100 microg/ml i baktericidnu aktivnost od 3.0-200.0 microg/ml.

Ampicilin je delovao inhibitorno od 0.0007-400.00 microg/ml i baktericidno od 0.0015-500.0 microg/ml, dok je Augmentin pokazao jaču antimikrobnu aktivnost od prethodna dva antibiotika, sa MIC od 0.0015-20.0 microg/ml i MBC od 0.003-30.0 microg/ml. Ciproxin je delovao sa MIC od 0.0007-45.00 i MBC od 0.0015-100.0

microg/ml, a Klaricid je pokazao antimikrobno dejstvo pri MIC 0.007-50.0 microg/ml i MBC 0.003-100.0 microg/ml (Tabela 1., Grafik 1).

Ispitivani preparat **"Probotanic Ulje divljeg origana"** pokazao je bolju antibakterijsku aktivnost od komercijalnog leka streptomicina i to nekoliko puta. Preparat je takođe delovao jačim antibakterijskim potencijalom i od Ampicilina (sa izuzetkom na *Streptococcus salivarius* i *E. faecalis*), od Augmentina (izuzev na *E.coli*), od Ciproxina (sem na *Proteus mirabilis*, *E.coli* i *Yersinia enterocolitica*) i od Klaricida (sa izuzetkom na *Streptococcus salivarius*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *E.coli*).

Testirani preparat je u veoma niskim koncentracijama delovao inhibitorno i fungicidno na sve tretirane gljive. Najbolju aktivnost pokazao je na vrstu *Aspergillus fumigates* sa MIC od 0.10 microg/ml i MFC od 0.40 microg/ml. *Candida albicans* je bila najotpornija gljiva na **"Probotanic Ulje divljeg origana"** sa MIC od 0.30 microg/ml i MFC od 0.60 microg/ml.

Bifonazol je pokazao inhibitornu aktivnost od 100-200 microg/ml i fungicidnu na 200-300 microg/ml. Ketokonazol je delovao inhibitorno na 50-1500 microg/ml i fungicidno na 100-2000 microg/ml. Ispitivani preparat pokazao je znatno jači antifungalni efekat od komercijalnih lekova (Tabela 2, Grafik 2.).

Uzimajući u obzir da je u poslednjih nekoliko godina učestalost rezistencije mikroorganizama na postojeće sintetičke antibiotike sve veća, kao i toksičnost komercijalnih preparata na humane ćelije, javlja se potreba za novim polusintetskim ili prirodnim antumikrobnim agensima koji nemaju štetnog efekta na zdravlje ljudi.

S tim u vezi kao i na osnovu pregleda literature i odrađene *in vitro* analize može se izvesti sledeći **zaključak**.

Ispitivani preparat "Probotanic Ulje divljeg origana" pokazao je dobru antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, nekoliko puta veću od antibiotika (sem pomenutih izuzetaka, i mikotika). Opravdavno je korišćenje proizvoda "Probotanic Ulje divljeg origana" u prevenciji raznih bakterijskih i gljivičnih infekcija izazvanih gore pomenutim vrstama. Osobine ovog proizvoda, kao i činjenica da je pojava rezistencije na prirodne preparate znatno manja, idu u prilog ovom zaključku.

Reference:

Hanel H. and Raether W. (1988): A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses* 31, 148-154.

Soković M., Glamočlija J., Marin D.P., 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

Dr Marina Soković

Naučni savetnik
Mikolška laboratorija IBISS



Dr Pavle Pavlović

Naučni savetnik
Direktor IBISS

U istraživanju su korišćene sledeće vrste bakterija: *Streptococcus pyogenes* (IBRS S003), *Streptococcus salivarius* (IBRS S006), *Streptococcus sanguinis* (IBRS S002), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 11, *Proteus mirabilis* (klinički izolat), *Pseudomonas aeruginosa* (IBRS P001), *Bacillus cereus* (clinical isolate), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Salmonella enteritidis* (klinički izolat), *Salmonella infantis* (klinički izolat), *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Enterobacter cloacae* (human isolate), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Yersinia enterocolitica* (klinički izolat), *Serratia marcescens* (klinički izolat). Za istraživanje antifungalne aktivnosti *in vitro* korišćena je *Candida albicans* (IBRS MH4), *Candida krusei* (IBRS 1flac1), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus fumigatus* (human isolate), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066) and *Trichoderma viride* (IAM 5061). Svi mikroorganizmi su deponovani u Mikoteci Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu. Za pozitivnu kontrolu korišćeni su sledeći antibiotici: Streptomycin, Ampicillin, Augmentin, Ciproxin i Klaricid, i dva mikotika: bifonazol i ketokonazol.

Tabela 1. Antibakterijska aktivnost etarskog ulja divljeg origana (*Origanum minutiflorum*) - Probotanic i antibiotika (µg/ml).

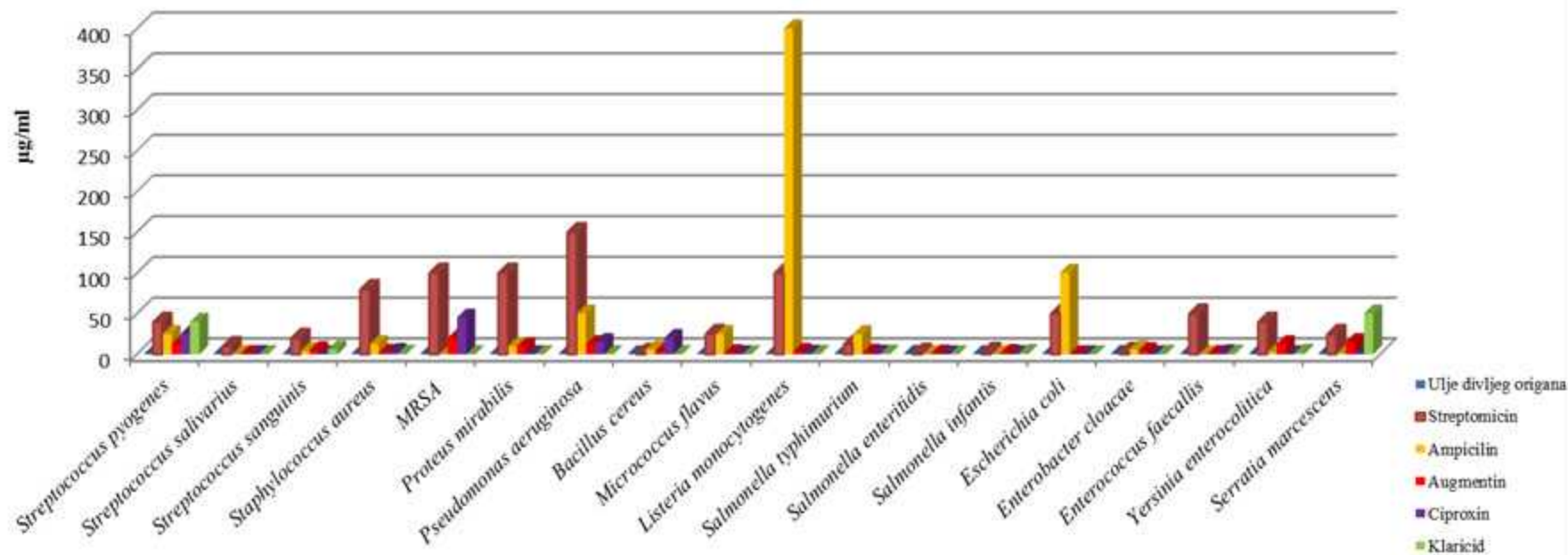
	Ulje divljeg origana MIC MBC	Streptomycin MIC MBC	Ampicilin MIC MBC	Augmentin MIC MBC	Ciproxin MIC MBC	Klaricid MIC MBC
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.20 0.30	40.0 80.0	25.0 100.0	12.5 25.0	25.0 100.0	40.0 50.0
<i>Streptococcus salivarius</i>	0.04 0.075	10.0 20.0	0.0007 0.0015	0.2 0.3	0.3 0.6	0.007 0.015
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0.10 0.15	20.0 40.0	4.0 6.0	5.0 10.0	0.15 0.3	6.0 12.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.60 1.20	80.0 160.0	12.5 25.0	2.0 3.0	3.0 6.0	0.5 0.6
meticilin-rezistant <i>Staphylococcus aureus</i>	0.10 0.15	100.0 -	- -	20.0 30.0	45.0 60.0	0.02 0.03
<i>Proteus mirabilis</i>	0.04 0.075	100.0 200.0	10.0 12.5	10.0 12.5	0.007 0.015	0.003 0.007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.30 0.6	150.0 200.0	50.0 100.0	12.5 25.0	15.0 30.0	0.15 0.3
<i>Bacillus cereus</i>	0.075 0.15	1.50 3.00	6.0 25.0	3.0 6.0	20.0 30.0	0.0015 0.003
<i>Micrococcus flavus</i>	0.01 0.015	25.0 50.0	25.0 40.0	1.25 2.5	0.02 0.03	0.015 0.03
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.30 0.60	100.0 200.0	400.0 500.0	3.0 6.0	0.6 1.2	0.3 1.2
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.30 0.60	12.5 25.0	25.0 50.0	2.0 2.5	0.6 2.5	0.6 1.2
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.30 0.60	1.50 3.0	0.03 0.06	1.0 1.5	0.15 0.3	0.02 0.03
<i>Salmonella infantis</i>	0.10 0.15	3.0 6.0	0.03 0.06	1.5 3.0	0.02 0.03	1.5 2.5
<i>Escherichia coli</i>	0.075 0.15	50.0 100.0	100.0 200.0	0.0015 0.003	0.007 0.015	0.007 0.015
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.30 0.60	3.0 6.0	6.0 12.0	4.0 6.0	0.02 0.03	0.5 0.6
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.45 0.60	50.0 60.0	0.015 0.030	0.2 0.3	1.2 2.5	0.5 0.6
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.20 0.60	40.0 50.0	3.0 6.0	12.5 25.0	0.0007 0.0015	2.0 3.0
<i>Serratia marcescens</i>	0.45 0.60	25.0 50.0	1.0 1.5	15.0 25.0	1.5 3.0	50.0 100.0

- nema aktivnost

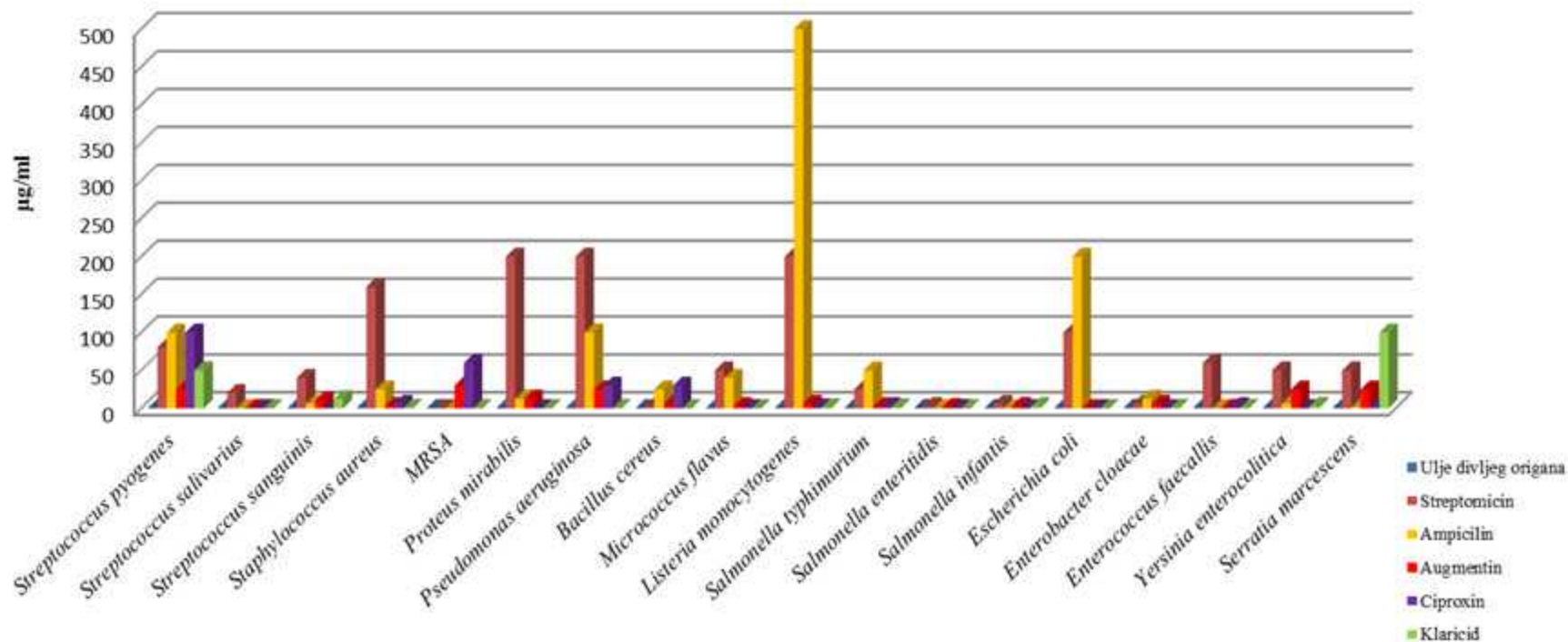
Tabela 2. Antifungalna aktivnost etarskog ulja divljeg origana (*Origanum minutiflorum*) - Probotanic i mikotika (µg/ml).

	Ulje divljeg origana MIC MFC	Bifonazol MIC MFC	Ketokonazol MIC MFC
<i>Aspergillus niger</i>	0.02 0.04	150 200	200 500
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.01 0.04	150 200	200 500
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.02 0.04	100 200	200 500
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.04 0.075	150 200	1500 2000
<i>Trichoderma viride</i>	0.02 0.04	150 200	1000 1000
<i>Candida albicans</i>	0.30 0.60	200 300	1500 2000
<i>Candida krusei</i>	0.075 0.15	100 200	50 100

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ulja divljeg origana i antibiotika



Minimalna bakterična koncentracija (MBK) ulja divljeg origana i antibiotika



Minimalne inhibitorne (MIK) i fungicidne (MFK) koncentracije ulja divljeg origana i mikotika

