

Utjecaj eteričnog ulja *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don na nastanak biofima netuberkuloznih mikobakterija

Influence of essential oil *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don on the formation of non-tuberculous mycobacterial biofilm

Dolores Peruć^{1*}, Ivana Gobin¹, Dalibor Broznić², Mladenka Malenica Staver³, Brigita Tićac¹

¹Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

²Zavod za kemiju i biokemiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

³Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Sažetak. Cilj: Ispitati antimikrobni i antioksidacijski učinak te sposobnost inhibicije biofilma eteričnog ulja (EU) smilja [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (*H. italicum*)] prema netuberkuloznim mikobakterijama *M. avium* i *M. intracellulare*. **Materijali i metode:** Za određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) EU *H. italicum* prema *M. avium* i *M. intracellulare* korištena je metoda mikrodilucije u bujonu. Preživljavanje mikobakterija u Middlebrook 7H9 bujonu pod utjecajem EU-a smilja praćeno je subkultivacijom suspenzija nulti, 1., 4. i 8. dan. Za određivanje inhibicije stvaranja biofilma u vodi primijenjena je metoda bojenja biofilma s kristal violetom. Antioksidacijski učinak MIK koncentracije EU-a određen je DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) metodom. **Rezultati:** MIK i MBK vrijednost EU-a smilja iznosila je 3,2 mg/ml. Koncentracija ½ MIK vrijednosti dovela je nakon prvog dana do redukcije vijabilnosti *M. avium* za približno $2 \log_{10}$ odnosno $2,5 \log_{10}$ za *M. intracellulare*, dok je četvrti dan zabilježena potpuna inhibicija porasta obiju vrsti mikobakterija. *M. avium* pokazao je veću tendenciju stvaranja biofilma. Koncentracija od ¼ i ½ MIK vrijednosti dovela je do statistički značajne inhibicije stvaranja biofilma ispitivanih mikobakterija. MIK koncentracija EU *H. italicum* je nakon 60 minuta inhibirala 38,2 % DPPH radikala. **Zaključak:** Subinhibitorne koncentracije EU-a smilja značajno reduciraju vijabilnost *M. avium* i *M. intracellulare* i dovode do značajne inhibicije stvaranja biofilma ispitivanih mikobakterija u vodi, što bi omogućilo primjenu niskih efektivnih koncentracija ovog eteričnog ulja, koje nemaju citotoksični učinak, kao prirodnog dezinficijensa u vodi.

Cljučne riječi: antimikobakterijska sredstva; antioksidansi; biofilm; eterična ulja; *Helichrysum*, netuberkulozne mikobakterije

Abstract. Aim: To investigate the antimicrobial and antioxidative effect of the essential oil (EO) of immortelle [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (*H. italicum*)] and its ability to inhibit biofilm of nontuberculous mycobacteria, *M. avium* and *M. intracellulare*. **Materials and methods:** a broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) of the *H. italicum* EO. Survival of mycobacteria in Middlebrook 7H9 broth under the influence of *H. italicum* EO was monitored by subcultivation of suspension of 0, 1, 4 and 8 days. For determination of the inhibition of biofilm formation in water, the biofilm coloring method with crystal violet was applied. The antioxidant effect of MIC concentrations of *H. italicum* EO was determined by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) method. **Results:** MIC and MBC value of immortelle EO was 3.2 mg/ml. Treatment of mycobacteria with *H. italicum* EO at one half times the MIC resulted in approximately $2 \log_{10}$ reduction of *M. avium* and $2.5 \log_{10}$ *M. intracellulare* respectively over 24 h, and complete reduction of both mycobacteria on the fourth day. *M. avium* showed a greater tendency to form biofilms. The concentration of one-quarter and one-half of the MIC values resulted in statistically significant inhibition of biofilm production of the tested mycobacteria. MIC concentrations of *H. italicum* EU after 60 minutes inhibited 38.2 % of DPPH radicals. **Conclusion:** The subinhibitory concentrations of *H. italicum* EO

***Dopisni autor:**

Dolores Peruć, dr. med.

Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: dolores.peruc@uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

significantly reduce the viability of *M. avium* and *M. intracellulare* and result in substantial inhibition of biofilm production of the tested mycobacteria in water, which would allow the application of low effective concentrations of this EO that do not have a cytotoxic effect as a natural disinfectant in water.

Key words: antimycobacterial agents; biofilms; free radical scavengers; *Helichrysum*; nontuberculous mycobacteria; oils volatile

UVOD

Netuberkulozne mikobakterije (engl. *Nontuberculosis Mycobacteria*, NTM) široko su rasprostranjene u prirodnom okolišu kao slobodno živuće saprofitne bakterije, komenzali ili simbioti. Najčešće su apatogene, no polovinom prošlog stoljeća uočen je njihov patogeni potencijal^{1,2}. Njihov značaj dodatno je porastao s pojavom epidemije AIDS-a i sve većeg broja imunokompromitiranih pacijenata zbog onkoloških, hematoloških i autoimunih bolesti te transplantacije organa³⁻⁶. Prenose se ingestijom, inhalacijom i inokulacijom iz okoliša⁷. Vodeni okoliš, uključujući i pitku vodu, predstavlja vrlo važan rezervoar za umnožavanje i širenje NTM-a zbog njihovih relativno niskih nutritivnih zahtjeva, sposobnosti stvaranja biofilma na različitim materijalima i otpornosti na klorne dezinficijense^{2,8-13}. Veza između stvaranja biofilma i infekcije najprije je opisana kod *Mycobacterium avium* (*M. avium*)². Biofilm je sesilna zajednica mikroorganizama u kojoj su mikrobne stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno, uklopljene u vlastiti izvanstanični polisaharidni matriks. Imaju izmijenjen fenotip zbog promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena. Te osobine ne uočavamo kod planktonskih organizama iste vrste¹⁴. Struktura biofilma i organizacija bakterijskog života u ovoj kompleksnoj zajednici potencira otpornost prema brojnim fizikalnim i kemijskim faktorima, uključujući i antibiotike. Zbog navedenih činjenica raste potreba za otkrivanjem novih antimikrobnih tvari. Biljni svijet predstavlja bogat izvor bioaktivnih, potencijalno antimikrobnih supstanci. Eterična ulja (EU) dobivena iz biljnog materijala poznata su kroz povijest po svojim antimikrobnim i antioksidacijskim svojstvima¹⁵. Dobivaju se iz različitih

dijelova biljaka postupcima destilacije, ekstrakcije ili tiještenja. EU su prirodne složene smjese hlapljivih, lipofilnih i mirisnih komponenti, nastale sekundarnim metabolizmom biljaka¹⁶. Njihov kemijski sastav obuhvaća nekoliko stotina različitih organskih spojeva. Najvećim dijelom su to različiti terpeni: monoterpeni, hemiterpeni, seskviterpeni i diterpeni te njihovi derivati: alkoholi, kiseline, aldehidi, esteri, ketoni, fenoli i oksidi.

Glavna komponenta eteričnih ulja smilja i borovice je α -pinen. Učinak izdvojenog α -pinena na mikobakterije znatno je slabiji od cjelovitog eteričnog ulja u kojemu sastavne komponente djeluju sinergistički. Eterično ulje smilja u našoj studiji pokazalo je značajan antimikobakterijski učinak, što do sada nije bilo poznato.

EU mogu sadržavati i više desetaka komponenti ali najčešće dominira jedna ili njih nekoliko koje mu daju karakteristična svojstva. Zastupljenost pojedinih komponenti ovisi o geografskom podrijetlu, dijelu biljke koji se koristi, vegetativnom razdoblju, zrelosti biljke i plodova, metodi izolacije EU-a i kemotipu biljke. Antimikrobno djelovanje EU-a uvjetovano je njihovim kemijskim sastavom, funkcionalnim grupama i mogućim sinergističkim učinkom između različitih komponenti^{15,16}. Smilje [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (*H. italicum*)] je višegodišnja cvjetnica, pripadnik roda *Helichrysum*, iz obitelji *Asteraceae*. Tipična je mediteranska biljka, široko rasprostranjena uzduž jadranske obale i na otocima. Odavno se koristi u tradicionalnoj medicini zbog svojih protuupalnih, antimikrobnih i antioksidacijska svojstava^{17,18}. NTM su visoko zastupljene u prirodnom okolišu, naročito vodenim sustavima, odakle se mogu prenijeti na osjetljive domačine. U takvim prirodnim okolišima najpovoljnije bi bilo primijeniti antimikrobna sredstva iz prirodnih izvora koja u efektivnoj koncentraciji nemaju štetan utjecaj na organizam čovjeka. Cilj našeg istraživanja bio je ispitati antimikrobnu djelotvornost EU-a smilja prema dvije vrste NTM-a, *M. avium* i *M. intracellulare* te utjecaj na njihov potencijal stvaranja biofilma u vodi.

MATERIJALI I METODE

Eterično ulje

Eterično ulje smilja, *H. italicum* dobiveno je od "Ireks aroma d. o. o." Zagreb. Nadzemni dijelovi biljke u cvatućem stadiju ubrani su u kontinentalnim dijelovima Zadarske i Šibensko-kninske županije. Osnovna suspenzija EU-a otopljena je u dimetilsulfoksidu (DMSO). Iz masene koncentracije, volumnog udjela i molarne mase, definiran je

Hidrofobna građa mikobakterija olakšava njihovo širenje aerosolom, stvaranje biofilma, otpornost na dezinficijense i antimikrobne lijekove. Subinhibitorne koncentracije eteričnog ulja smilja značajno reduciraju vijabilnost netuberkuloznih mikobakterija i inhibiraju stvaranje biofilma u vodi, pa bi se niske učinkovite koncentracije koje nemaju citotoksični učinak mogle koristiti kao prirodni dezinficijens u vodi.

volumen osnovne suspenzije koji treba razrijediti da bismo dobili izvornu (stock) koncentraciju od 200 mg/ml. Malenica Staver i suradnici odredili su kemijski sastav ovog EU-a smilja metodom plinske kromatografije i spektrometrije masa u kojem najveći udio čine α -pinen (21,6 %) i γ -kurkumen (21,6 %), slijedi β -selinen (6,5 %), isoitalicen (5,4 %), β -kariofilen (4,9 %) i α -kurkumen (4,5 %) ¹⁹.

Bakterijske kulture

Korišteni su bakterijski sojevi iz ATCC zbirke (engl. *American Type Culture Collection*), *Mycobacterium avium* ssp. *avium* (serotip 2) ATCC 25291 (*M. avium*) i *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950 (*M. intracellulare*). Subkultivirani su dva puta u Middlebrook 7H9 bujonu (7H9, Difco, Detroit, Michigan, SAD) obogaćenom dodatkom 10 % albumin-dekstroza-katalaze (ADC, Biolife, Milano, Italija) te 0,05 % Tween 80 (Tw80, Biolife, Milano, Italija) na 37 °C kroz dva tjedna dok suspenzija bakterija ne dostigne broj od 10⁸ CFU/ml (engl. *colony forming unit*). *Bakterijska suspenzija je alikvotirana i zamrznuta na – 80 °C uz dodatak 10 % glicerola*. Alikvoti su po potrebi odmrzavani i subkultivirani na 7H9 kroz 2 tjedna, a potom na Middlebrook 7H10 agaru (7H10, Difco, Detroit,

Michigan, SAD) obogaćenom s dodatkom 10 % oleinska kiselina-albumin-dekstroza- katalaze (OADC, Biolife, Milano, Italija) te 0,05 % Tw80 na 37 °C kroz još dva tjedna. Inicijalni inokulum provjeren je subkultivacijom razrjeđenja na 7H10 s 10 % OADC i 0,05 % Tw80 na 37 °C do pojave vidljivog porasta kroz 4 do 6 tjedana.

Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije i minimalne baktericidne koncentracije

Za određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) EU *H. italicum* prema *M. avium* i *M. intracellulare* korištena je metoda mikrodilucije u bujonu. U sterilnim mikrotitarskim pločicama (Vacutest Kima s. r. l., Arzergrande, Padova, Italija) napravljena su dvostruka serijska razrjeđenja EU *H. italicum* u 7H9 s 10 % ADC i 0,05 % Tw80 počevši od 0,1 do 51,2 mg/ml. U svako razrjeđenje EU-a dodana je suspenzija *M. avium* ili *M. intracellulare* i 0,015 % otopina rezazurina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD) do konačnog volumena od 200 μ l i 1 \times 10⁶ CFU/ml svake mikobakterijske vrste.

Resazurin je oksido-redukcijski indikator plave boje, bez fluorescencije koji se koristi za kontrolu bakterijskog rasta. Mijenja boju u fluorescentno ružičastu nakon redukcije u resorufin²⁰. Osim negativne, kontrole sterilnosti, kao pozitivna kontrola korišten je amikacin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD). Pločice su inkubirane 24 h na 37 °C uz miješanje na 120 rpm (UNIMAX 1010 shaker, Heidolph, Schwabach, Njemačka). Najniža koncentracija EU-a kod koje nije došlo do promjene boje označavala je MIK. Sva razrjeđenja EU-a kod kojih nije došlo do vizualne promjene boje presađena su na 7H10 obogaćenim s 10 % OADC i 0,05 % Tw80 te inkubirana sljedeća 4 tjedna na 37 °C. MBK je najniža koncentracija EU-a kod koje je došlo inhibicije rasta \geq 99 % CFU. Rezultat je izražen u mg/ml²¹.

Ispitivanje utjecaja EU *H. italicum* na preživljavanje *M. avium* i *M. intracellulare* u Middlebrook 7H9 bujonu

Ova metoda omogućuje praćenje antimikobakterijskog učinka EU-a u određenim vremenskim intervalima. Pripravljene su suspenzije *M. avium* i *M. intracellulare* u 7H9 s 10 % ADC i 0,05 % Tw80

u koje je dodano EU *H. italicum* u koncentraciji koja odgovara MIK-u i polovini MIK-a tako da je konačni broj bakterija u svakom razrjeđenju EU-a iznosio 10^6 CFU/ml. Inkubirane su uz miješanje na $37\text{ }^\circ\text{C}$. U različitim vremenskim razmacima (0, 1, 4, 8 dana) suspenzije su nasadene na 7H10 s 10 % OADC i 0,05 % Tw80 za određivanje CFU/ml. Kao kontrola su poslužile suspenzije *M. avium* i *M. intracellulare* bez EU-a²².

Ispitivanje utjecaja EU *H. italicum* na stvaranje biofilma *M. avium* i *M. intracellulare* u sterilnoj vodovodnoj vodi

Pripravljene su suspenzije *M. avium* i *M. intracellulare* u sterilnoj vodovodnoj vodi. U svaku jažicu sterilne mikrotitrarske pločice s ravnim dnom (Vacutest Kima s.r.l., Arzergrande, Padova, Italija) uneseno je 100 μl pojedine suspenzije mikobakterija i dodano 100 μl EU *H. italicum* u koncentraciji koja odgovara polovini odnosno četvrtini MIK-a tako da je konačni broj mikobakterija u svakom razrjeđenju EU-a iznosio 10^6 CFU/ml. Nakon 5 dana inkubacije na $37\text{ }^\circ\text{C}$ mikrotitrarska pločica je dva puta isprana sterilnom destiliranom vodom da bi se uklonile planktonske stanice. U svaku jažicu je zatim dodano 125 μl 0,1 % otopine kristal violeta i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi. Pločica je potom isprana 3 do 4 puta u sterilnoj destiliranoj vodi i ostavljena u obrnutom položaju da se posuši preko noći. Da bi se otopio kristal violet u svaku jažicu je sljedeći dan dodano 125 μl 30 % vodene otopine octene kiseline uz inkubaciju 15 minuta na sobnoj temperaturi. Otopljeni kristal violet iz svake jažice prenesen je u jažice nove mikrotitrarske pločice s ravnim dnom i očitana je apsorbancija (A_{620}) na valnoj duljini od 620 nm (Sunrise Absorbance reader, Tecan, Grödig/Salzburg, Austrija). Kao slijeпа proba korištena je 30 % vodena otopina octene kiseline, a kao negativna kontrola suspenzije *M. avium* ili *M. intracellulare* bez EU-a^{23,24}. Postotak inhibicije stvaranja biofilma određen je prema formuli:

$$\text{Postotak inhibicije (\%)} = 1 - \frac{A_{620} \text{ uzorka tretiranog EU-a}}{A_{620} \text{ uzorka negativne kontrole}} \times 100^{25}.$$

Mikroskopska analiza gustoće mikobakterijskog biofilma

Kulture *M. avium* i *M. intracellulare* na kojima se ispitivao utjecaj EU *H. italicum* na stvaranje biofilma u sterilnoj vodovodnoj vodi su nakon tretmana EU-om u koncentraciji od jedne polovine MIK-a isprane destiliranom vodom i pregledane pod povećanjem 40 \times invertnog mikroskopa (Olympus IX51, Tokio, Japan). Uspoređena je gustoća stvorenog biofilma u tretiranim i kontrolnim netretiranim uzorcima.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti EU *H. italicum* DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost EU *H. italicum* prikazana je gubitkom signala DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala²⁶. Svježe pripremljenoj otopini DPPH u etil-acetatu (koncentracije 0.1 mmol/l) dodana je MIK koncentracija EU *H. italicum*. Uzorci su zatim homogenizirani 10 sekundi na Vortex miješalici, a apsorbancija uzorka je izmjerena na valnoj duljini od 515 nm (Spekrofotometar, Cary 100 Bio WINUV, Mulgrave, Australia) u 60. minuti. Gubitak signala DPPH izražen je u %, a određen je prema sljedećem izrazu:

$$\text{gubitak signala DPPH (\%)} = \frac{A_0 - A_{\text{uzorka EU}}}{A_0} \times 100,$$

gdje je:

A_0 – apsorbancija otopine DPPH u etil-acetatu u nultoj minuti (negativna kontrola)

$A_{\text{uzorka EU}}$ – apsorbancija otopine uzorka EU-a u otopini DPPH u etil-acetatu u 60. minuti.

TEAC metoda (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) koristi se za mjerenje antioksidativnog kapaciteta, a izražava se u jedinicama nazvanim trolox ekvivalenti (engl. *Trolox Equivalents*, TE). Antioksidacijska aktivnost MIK koncentracije EU *H. italicum* izražena je trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, Trolox, Sigma–Aldrich Chemie, Njemačka) ekvivalentima u rasponu od 0 – 0,21 mmol/l. Trolox je hidrosolubilni analog vitamina E i antioksidans poput vitamina E te se koristi za smanjenje oksidacijskog stresa. Izračun trolox ekvivalenta u uzorku EU *H. italicum* dobiven je mjerenjem postotka gubitka signala uzorka EU-a i njegovim uvrštavanjem u jednadžbu pravca kalibracijske krivulje troloxa.

Dobivena vrijednost (mmol troloxa) podijeljena je s masom EU-a u alikvotu od 1,0 ml i pomnožena s 1000 da bismo mogli iskazati konačni rezultat u mmol trolox ekvivalenta na kg EU-a (mmol troloxa/kg EU).

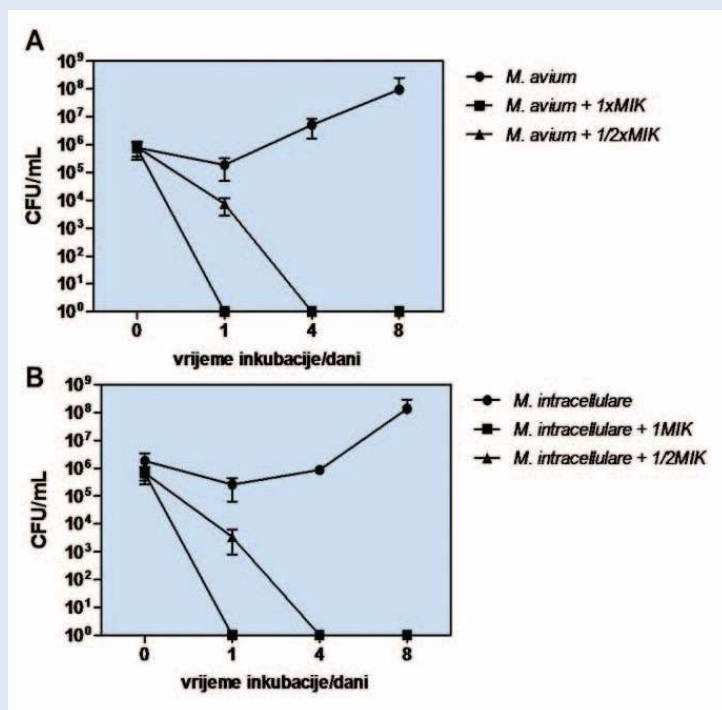
Statistička obrada podataka

U obradi podataka korišten je računalni program Statistica for Windows, inačica 12 (StratSoft, Inc. Tulsa, OK, Oklahoma, SAD). Određivanje MIK i MBK napravljeno je u triplicatu, a rezultat je izražen kao medijan. Ispitivanje preživljavanja, utjecaj na stvaranje i gustoću biofilma učinjen je u duplikatu, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost. Normalnost razdiobe podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike između

skupina uzoraka analizirane su testom Kruskal-Wallis ANOVA, dok je utjecaj EU-a na mikobakterije ispitan Mann-Whitneyjevim U-testom. *P* vrijednosti manje od 0,05 ($P < 0,05$) uzete su u obzir kao statistički značajne.

REZULTATI

Testirano eterično ulje smilja pokazalo je jednak antimikobakterijski učinak na *M. avium* i *M. intracellulare* (tablica 1). MIK i MBK vrijednost iznosila je 3,2 mg/ml. Kao pozitivna kontrola je testiran antibiotik amikacin, za koji je MIK vrijednost iznosila 0,004 mg/ml, a MBK 0,008 mg/ml. Kako bismo ispitali dinamiku djelovanja EU-a smilja određivali smo broj bakterija u 7H9 tijekom 8 dana. Tretman obje vrste mikobakterija s EU-a smilja u koncentraciji jedne polovine MIK vrijednosti doveo je do redukcije vijabilnosti nakon prvog dana za približno $2 \log_{10}$ (*M. avium*) odnosno $2,5 \log_{10}$ (*M. intracellulare*), dok je četvrti dan zabilježena potpuna inhibicija porasta obje vrste mikobakterija. MIK koncentracija EU-a smilja je nakon prvog dana potpuno reducirala obje vrste mikobakterija (slika 1). Ispitivane NTM pokazale su svojstvo stvaranja biofilma s tim da je vrsta *M. avium* imala veću tendenciju adherencije na polistiren i veću sposobnost stvaranja biofilma. Koncentracija od $\frac{1}{4}$ i $\frac{1}{2}$ MIK vrijednosti EU-a smilja dovela je do statistički značajne inhibicije stvaranja biofilma ispitivanih NTM-a (slika 2). Postotak inhibicije stvaranja biofilma kod *M. avium* iznosio je 15,75 % pri koncentraciji od jedne četvrtine, odnosno 20,7 % pri koncentraciji od jedne polovine MIK-a. Kod *M. intracellulare* postotak inhibicije biofilma uz koncentraciju od jedne četvrtine MIK-a iznosio je 14,77 %, a uz koncentraciju od jedne polovine MIK-a 16,15 %. Promatranjem nativnog biofilma pod invertnim mikroskopom nakon pet dana inkubacije vidi se da je biofilm u tretiranim uzorcima znatno rjeđi u odnosu na



Slika 1. Preživljavanje *M. avium* (A) i *M. intracellulare* (B) u Middlebrook 7H9 bujonu u kontrolnim uzorcima (●) i nakon djelovanja eteričnog ulja *H. italicum* u koncentraciji 1x MIK (■) i $\frac{1}{2}$ x MIK (▲) (MIK – minimalna inhibicijska koncentracija; CFU – engl. colony forming unit)

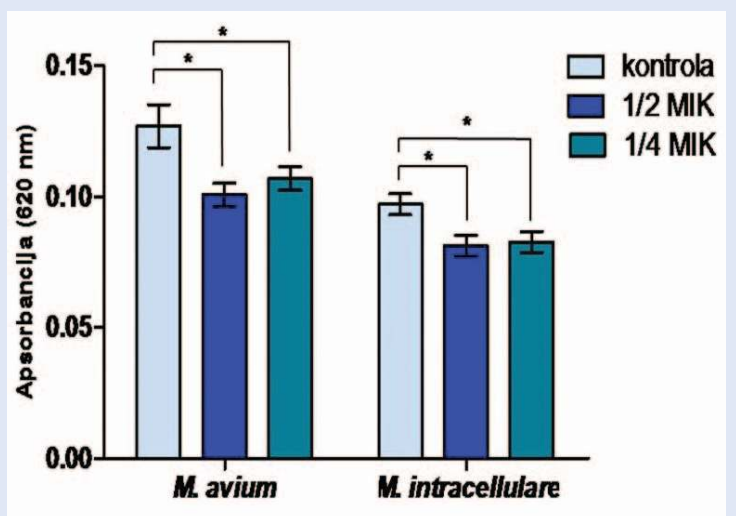
Tablica 1. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) eteričnog ulja *H. italicum* u Middlebrook 7H9 bujonu

	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
	MIK (mg/ml) / MBK (mg/ml)	
EU <i>H. italicum</i>	3,2 / 3,2	3,2 / 3,2
Amikacin	0,004 / 0,008	0,004 / 0,008

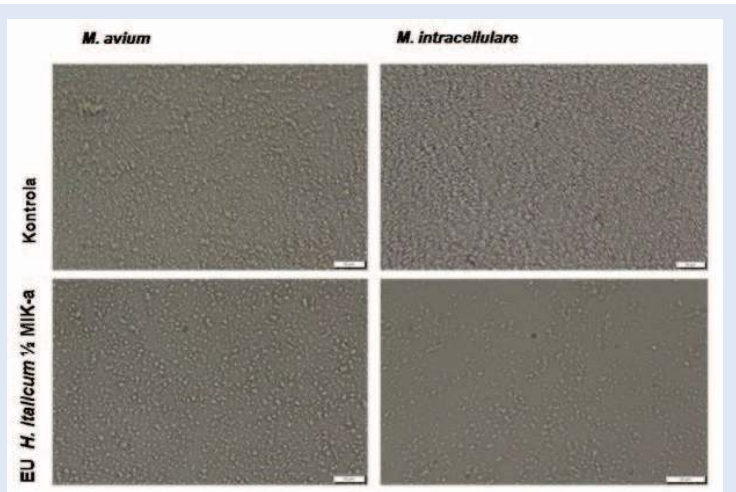
kontrolne netretirane uzorke (slika 3). MIK koncentracija EU *H. italicum* je nakon 60 minuta inhibirala 38,2 % DPPH radikala. Konačni rezultat u 60. minuti iznosio je 0,1301 mmol troloxa/kg EU-a.

RASPRAVA

Bakterije u biofilmu imaju značajno povećanu toleranciju na antimikrobne lijekove i imunološki odgovor domaćina. Prema novijoj hipotezi perzisteri, odnosno mala subpopulacija bakterija u biofilmu je u stanju mirovanja, bez metaboličke aktivnosti te zato neosjetljiva na antimikrobne lijekove²⁷. Naša studija bila je usmjerena na praćenje inhibicijskog učinka EU-a smilja na preživljavanje *M. avium* i *M. intracellulare* u Middlebrook 7H9 bujonu i stvaranje njihovog biofilma u vodi. Hidrofobna građa mikobakterija olakšava njihovo širenje aerosolom, agregaciju i vezanje za različite površine, stvaranje biofilma, otpornost na dezinficijense i antimikrobne lijekove². Neke vrste mikobakterija osim na površinama mogu formirati biofilm i na površini različitih medija²⁸. Vjerojatno je razlog različit sastav ekstracelularnog matriksa i lipidna građa staničnog zida mikobakterija²⁹. U našem istraživanju je *M. avium* pokazao veću sposobnost stvaranja biofilma u odnosu na *M. intracellulare*, što odgovara dostupnim istraživanjima². U sojeva *M. avium* i *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) tijekom stvaranja biofilma dolazi do pojačane ekspresije nekih gena koji reguliraju sintezu glikopeptidolipida (GPL), što ukazuje da su stvaranje biofilma i sinteza GPL-a usko povezani³⁰. Kod *M. smegmatis* utvrđeno je da tijekom njegove izloženosti antimikrobnim lijekovima dolazi do pojačane sinteze mikolične kiseline i selekcije rezistentnih perzistera³¹. Studije prisutnosti oportunističkih patogena u pitkoj gradskoj vodi i biofilmu na glavama tuša pokazale su da su NTM prisutne u oba uzorka^{12,32}. U uzorcima biofilma s tuševa udio *Mycobacterium* spp. bio je dvostruko veći nego u uzorcima pitke vode, a dominantne vrste su bile *Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*), *M. avium*, *M. intracellulare* i *Mycobacterium xenopi*^{12,32}. U pitkoj vodi bila je značajna prisutnost drugih NTM-a, kao što su *M. gordonae*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* i *Mycobacterium terrae*^{12,32}. Može se zaključiti da *M. avium* i *M. in-*



Slika 2. Učinak eteričnog ulja *H. italicum* u koncentraciji od 1/2 i 1/4 MIK vrijednosti na stvaranje biofilma *M. avium* i *M. intracellulare* u sterilnoj vodovodnoj vodi nakon petog dana (* statistički značajno, $P < 0,05$; MIK – minimalna inhibicijska koncentracija)



Slika 3. Pet dana stari biofilm *M. avium* i *M. intracellulare* pod invertirnim mikroskopom u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim s eteričnim uljem *H. italicum* u koncentraciji jedne polovine MIK-a (MIK – minimalna inhibicijska koncentracija)

tracellulare u vodenim sustavima uglavnom stvaraju biofilm u kojem perzistiraju. EU smilja u našoj studiji pokazalo je antimikobakterijski učinak na obje ispitivane NTM, što do sada nije bilo poznato. Antimikrobni učinak ovog EU-a istraživao je u nekoliko studija prema gram-pozitivnim (*Staphylococcus aureus*) i različitim gram-negativnim bakterijama (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*), kao i kvascima (*Candida albicans*)^{19,33-35}. Poznato je da

su gram-negativne bakterije osjetljivije na djelovanje EU-a nego gram-pozitivne zbog specifične građe bakterijskog zida u kojem se nalazi periplazmatski prostor i vanjska membrana koje ograničavaju difuziju hidrofobnih molekula³⁵. Sastav EU-a može znatno varirati a time i njegov antimikrobni učinak. EU *H. italicum* s područja Hrvatske prema dosad dostupnim istraživanjima uobičajeno ima visok sadržaj α - pinena, γ - i α - kurkumena, α - i β - selinena i neril acetata^{17,19,33}. Kako je α - pinen bio dominantna komponenta i EU-a plodova borovice (*Juniperus communis*) čiji smo učinak prema NTM-u testirali u prethodnom istraživanju, smatrali smo da je upravo ta komponenta odgovorna za antimikobakterijski učinak³⁶. Međutim kada smo testirali izolirani α - pinen, njegova MIK vrijednost bila je tri puta veća od EU-a borovice i dva puta veća od EU-a smilja, što govori u prilog tezi da komponente eteričnog ulja djeluju sinergistički. Moguće je da se sinergistički učinak postiže tako da određena komponenta EU-a mijenja permeabilnost stanične membrane te olakšava ulazak druge aktivne komponente. Na taj način i subinhibitorne koncentracije dvaju EU-a mogu postići antimikrobni efekt, što smo u svom radu postigli i mi korištenjem samo EU-a smilja u koncentraciji od ½ MIK-a i ¼ MIK-a¹⁵.

ZAKLJUČAK

EU smilja pokazalo je inhibitorni učinak na preživljavanje *M. avium* i *M. intracellulare*. U subinhibitornim koncentracijama u vodenom mediju značajno smanjuje nastanak biofilma ispitivanih NTM, što bi omogućilo primjenu niskih efektivnih koncentracija ovog EU-a koje nemaju citotoksični učinak. Treba razmotriti mogućnosti njegovog korištenja kao prirodnog dezinficijensa u vodi. Ova studija može poslužiti kao uvod u daljnja istraživanja mehanizma antimikobakterijskog učinka EU-a smilja i pronalaženje potencijalnog sinergističkog učinka s drugim eteričnim uljima mediteranskih biljaka.

Zahvala

Rad je izrađen u okviru projekata broj 13.06.2.2.60 i broj 13.06.1.1.07 s potporom Sveučilišta u Rijeci.

Izjava o sukobu interesa: autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Buhler VB, Pollak A. Human infection with atypical acid-fast organisms; report of two cases with pathologic findings. *Am J Clin Pathol* 1953;23:363-74.
2. Faria S, Joao I, Jordao L. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. *J Pathog* 2015;2015:1-10.
3. Varley CD, Ku JH, Henkle E, Schafer SD, Winthrop KL. Disseminated Nontuberculous Mycobacteria in HIV-Infected Patients, Oregon, USA, 2007-2012. *Emerg Infect Dis* 2017;23:533-5.
4. Henkle E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. *Clin Chest Med* 2015;36:91-9.
5. Jankovic M, Zmak L, Krajcinovic V, Viskovic K, Crnek SS, Obrovac M et al. A fatal Mycobacterium chelonae infection in an immunosuppressed patient with systemic lupus erythematosus and concomitant Fahr's syndrome. *J Infect Chemother* 2011;17:264-7.
6. Jankovic Makek M, Pavlisa G, Jakopovic M, Redzepi G, Zmak L, Vukic Dugac A et al. Early onset of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease contributes to the lethal outcome in lung transplant recipients: report of two cases and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 2016;18:112-9.
7. Falkinham JO, 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:177-215.
8. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1025-32.
9. Taylor RH, Falkinham JO, 3rd, Norton CD, LeChevallier MW. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of Mycobacterium avium. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1702-5.
10. Schulze-Robbecke R, Janning B, Fischeider R. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tuber Lung Dis* 1992;73:141-4.
11. Sousa S, Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. *Int J Mycobacteriol* 2015;4:36-43.
12. Richards JP, Ojha AK. Mycobacterial Biofilms. *Microbiol Spectr* 2014;2 [Internet]. [cited 2018 Jun 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104368>.
13. Kulka K, Hatfull G, Ojha AK. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms. *J Vis Exp* 2012 [Internet]. [cited 2018 Jun 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22371116>.
14. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93.
15. Bassole IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012;17:3989-4006.
16. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46:446-75.
17. Mastelic J, Politeo O, Jerkovic I. Contribution to the analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Determination of ester bonded acids and phenols. *Molecules* 2008;13:795-803.

18. Antunes Viegas D, Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol* 2014;151:54-65.
19. Malenica Staver M, Gobin I, Ratkaj I, Petrović M, Vulinović A, Dinarina-Sablić M et al. In vitro antiproliferative and antimicrobial activity of the essential oil from the flowers and leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don growing in Central Dalmatia (Croatia). *J Essent Oil Bear Pl.* 2018;21:77-91.
20. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007;42:321-4.
21. Andrejak C, Almeida DV, Tyagi S, Converse PJ, Ammerman NC, Grosset JH. Characterization of mouse models of *Mycobacterium avium* complex infection and evaluation of drug combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:2129-35.
22. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1914-20.
23. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* 2011 [Internet]. [cited 2018 Jun 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307833>.
24. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol* 2005 [Internet]. [cited 2018 Jun 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18770545>.
25. Teanpaisan R, Kawsud P, Pahumunto N, Puripattanavong J. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *J Tradit Complement Med* 2017;7:172-7.
26. Kalantzakis G, Blekas G, Pegklidou K, Boskou D. Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *Eur J Lipid Sci Tech* 2006;108:329-35.
27. Vraneš J, Leskovar V. Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Med Glas* 2009;6:147-64.
28. Ojha AK, Jacobs WR, Jr, Hatfull GF. Genetic dissection of mycobacterial biofilms. *Methods Mol Biol* 2015;1285: 215-26.
29. Esteban J, Garcia-Coca M. *Mycobacterium* Biofilms. *Front Microbiol* 2017;8:2651.
30. Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Macnab M, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:819-25.
31. Ojha AK, Trivelli X, Guerardel Y, Kremer L, Hatfull GF. Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. *J Biol Chem.* 2010;285:17380-9.
32. Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, Frank DN, Harris JK, Pace NR. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:16393-9.
33. Mastelic J, Politeo O, Jerkovic I, Radosevic N. Composition and Antimicrobial Activity of *Helichrysum italicum* Essential Oil and Its Terpene and Terpenoid Fractions. *Chemistry of Natural Compounds* 2005;41:35-40.
34. Nostro A, Bisignano G, Angela Cannatelli M, Crisafi G, Paola Germano M, Alonzo V. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17: 517-20.
35. Guinoiseau E, Lorenzi V, Luciani A, Muselli A, Costa J, Casanova J et al. Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. *In: Méndez-Vilas A* (ed). *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz: Formatex Research Center, 2013;1073-80.
36. Peruć D, Gobin I, Abram M, Broznić D, Svalina T, Štifter S et al. Antimycobacterial potential of the juniperberry essential oil in tap water. *Arh Hig Rada Toksikol* 2018; 69:46-54.