



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Budimir S. Ilić

**HEMOMETRIJSKA ANALIZA REZULTATA HEMIJSKIH I
BIOLOŠKIH ISTRAŽIVANJA FARMAKOLOŠKI
ZNAČAJNIH BILJAKA**

Doktorska disertacija

Niš, 2014



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Budimir S. Ilić

**CHEMOMETRIC ANALYSIS OF CHEMICAL AND
BIOLOGICAL STUDIES OF PHARMACOLOGICALLY
IMPORTANT PLANTS**

PhD thesis

Niš, 2014

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Instituta za javno zdravlje u Nišu, Prirodno-Matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu i Instituta za hemiju tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

Izrada ove doktorske disertacije je realizovana u okviru projekta OI 171025 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru dr Dragoljubu L. Miladinoviću, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Nišu, koji je predložio temu i rukovodio izradom ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i Prof. dr Vesni P. Stankov-Jovanović, na nesebičnoj pomoći i nizu korisnih sugestija i saveta koji su uticali na kvalitet same disertacije.

Sa zadovoljstvom se zahvaljujem profesorima i kolegama na izuzetnoj saradnji i stručnoj pomoći: Prof. dr Tatjani M. Mihajilov Krstev, Prof. dr Nikoli D. Nikoliću, Prof. dr Branislavi D. Kocić, Prof. dr Vidosavu L. Markoviću, Prof. dr Olgi G. Cvetković i Dejanu M. Nikoliću, spec. sanitarne hemije.

Najsrdahnije se zahvaljujem mojoj porodici i prijateljima, na ogromnom strpljenju, razumevanju i nesebičnoj podršci u teškim trenucima svih ovih godina.



**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:	Будимир С. Илић
Ментор, МН:	Драгољуб Л. Миладиновић
Наслов рада, НР:	ХЕМОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА ХЕМИЈСКИХ И БИОЛОШКИХ ИСТРАЖИВАЊА ФАРМАКОЛОШКИ ЗНАЧАЈНИХ БИЉАКА
Језик публикације, ЈП:	Српски
Језик извода, ЈИ:	Енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2014.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	217 страна, 49 табела, 47 слика и 242 референце
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	медицинска хемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Хеометрија, биљке, биогени елементи, етарска уља, антибиотици, антибактеријска активност, синергизам, молекуларни докинг
УДК	(543.068 + 54 + 57) : (633.8 + 615.1)
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Експериментални део је урађен у лабораторијама Медицинског факултета Универзитета у Нишу, Института за јавно здравље у Нишу, Природно-Математичког факултета Универзитета у Нишу, Института за хемију технологију и металургију Универзитета у Београду.
Извод, ИЗ:	Биљке синтетишу примарне и секундарне метаболите помоћу једноставних молекула, међу којима значајно место заузимају неорганска једињења. Истраживање екстрактивности и растворљивости елемената у земљишту помаже објашњењу механизма апсорпције истих од стране биљних врста.

Осим примарних и секундарних метаболита који имају доказана лековита својства, биљке су извор неопходних елемената битних за оптимално функционисање људског организма на биохемијском нивоу.

Имајући у виду резистенцију бактерија на синтетичке антибиотике последњих деценија, неопходно је систематски трагати за новим антибактеријским агенсима, а етарска уља су потенцијално најбогије налазиште природних антибиотика. Развој нових метода заснованих на комбинованој интеракцији синтетичких и природних антибиотика може помоћи у решавању бактеријске резистентности.

Један број научних истраживања која се реализују последњих година, усмерена су ка анализи добијених експерименталних резултата хеометријским методама. У зависности од начина поставке проблема, тј. у зависности од одабира променљивих, хеометријске методе и тумачење корелационих односа можемо применити на експерименталне системе, у циљу објашњења њихове повезаности, сличности и разлика. Од недавно се хеометријске методе примењују у анализи екосистема, у циљу објашњења дистрибуције и акумулације појединих минерала у земљишту и биљкама. Такође се интензивно проучава зависност хемијске структуре природних и синтетичких анбиотика и њихове фармаколошке активности.

Датум прихватања теме, ДП :	28.01.2013. године
Датум одбране, ДО :	
Чланови комисије, КО :	Председник:
	Члан:
	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 :	Budimir S. Ilić
Mentor, MN :	Dragoljub L. Miladinović
Title, TI :	CHEMOMETRIC ANALYSIS OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDIES OF PHARMACOLOGICALLY IMPORTANT PLANTS
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2014
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD :	217 pages, 49 tables, 47 figures and 242 references
Scientific field, SF :	chemistry
Scientific discipline, SD :	medicinal chemistry
Subject/Key words, S/KW :	Chemometry, plants, biogenic elements, essential oils, antibiotics, antibacterial activity, synergism, molecular docking
UC	(543.068 + 54 + 57) : (633.8 + 615.1)
Holding data, HD :	Library
Note, N :	The experimental work was performed in the research laboratories of the: Faculty of Medicine, University of Niš; Institute for Public Health, Niš; Faculty of Science and Mathematics, University of Niš; Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade.
Abstract, AB :	Plants synthesize primary and secondary metabolites from simple molecules, among which inorganic compounds are of great importance. Examining the extractability and solubility of the soil elements helps us explicate the mechanism of their adsorption by plants.

Besides primary and secondary metabolites, which were proven to have healing properties, plants are a source of necessary elements which are on a biochemical level important for optimal functioning of the human body.

Taking into regard the bacterial resistance towards synthetic antibiotics, in the past few decades, it is necessary to systematically search for new antibacterial agents, and essential oils are potentially the most abundant reservoir of natural antibiotics. The development of new methods based on a combined interaction of synthetic and natural antibiotics can help us solve the issue of bacterial resistance.

A number of scientific researches, which have been conducted in the past few years, have focused on analyzing the experimental results using chemometric methods. Depending on the angle from which the problem is approached; i.e. depending on the chosen variables, the chemometric method and the interpretation of correlations can be applied to experimental system, in order to determine its connections, similarities and differences. Recently, chemometric methods have started being used for ecosystem analysis, in order to determine the distribution and accumulation of specific minerals in the soil and plants. The dependance of chemical structures in natural and synthetic antibiotics and their pharmacological activities has also been a subject of intensive research.

Accepted by the Scientific Board on, ASB :	28.01.2013. year
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President:
	Member:
	Member:
	Member, Mentor:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	5
2.1. Biogeni elementi u biljkama	6
2.2. Etarska ulja.....	9
2.2.1. Literaturni pregled hemijskih i bioloških istraživanja terpenoida, odabranih biljnih vrsta	10
2.2.2. Antibakterijska aktivnost etarskog ulja.....	12
2.2.2.1. Strukturna građa bakterija.....	12
2.2.2.2. Struktura i funkcija ćelijskog zida bakterije.....	12
2.2.2.3. Struktura i funkcija citoplazmatične membrane	14
2.2.2.4. Sinteza proteina i njeni inhibitori.....	16
2.2.2.4.1. Hloramfenikol	18
2.2.2.4.2. Tetraciklin	19
2.2.2.4.3. Streptomicin	21
2.2.2.5. Mehanizam toksičnosti na citoplazmatičnoj membrani	22
2.3. Hemometrijske metode analize	25
2.3.1. Selektivna jon analiza (SIA)	25
2.3.2. Metoda glavnih komponenata (PCA) i klaster analize (HCA)	25
2.3.3. Metoda molekularnog dokinga (SAR).....	26
3. EKSPERIMENTALNI DEO	28
3.1. Biljni materijal, supstance i korišćene hemikalije.....	29
3.2. Određivanje sadržaja metala	29
3.2.1. Mikrotalasna digestija zemljišta i biljnog materijala	29
3.2.2. Analiza metala	30
3.2.3. Sekvencionalna BCR ekstrakcija.....	30
3.2.4. Ispitivanje uzoraka zemljišta metodom rendgenske difrakcije (XRD-analiza).....	31
3.2.5. Određivanje kiselosti, redoks potencijala, provodljivosti, sadržaja organske materije i katjonsko izmenjivačkog kapaciteta zemljišta	31
3.3. Hemijski sastav etarskih ulja.....	32
3.3.1. Izolovanje etarskog ulja	32
3.3.2. Gasna hromatografija (GC).....	32
3.3.3. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC-MS).....	32
3.3.4. Identifikacija komponenata etarskog ulja	32
3.4. Antibakterijska aktivnost ispitanih supstanci.....	33

3.4.1. Ispitane supstance	33
3.4.2. Bakterijski sojevi	33
3.4.3. Mikrodiluciona metoda	33
3.4.4. Mikrodiluciona "checkerboard" metoda	34
3.5. Hemometrijska obrada podataka	35
4. REZULTATI I DISKUSIJA	36
4.1. Sadržaj metala u zemljištu	37
4.1.1. Hemometrijska analiza sadržaja metala karbonatne frakcije zemljišta	37
4.1.2. Hemometrijska analiza sadržaja metala Fe/Mn oksidne frakcije zemljišta	40
4.1.3. Hemometrijska analiza sadržaja metala organske frakcije zemljišta	42
4.1.4. Hemometrijska analiza zemljišta na osnovu ukupnog sadržaja metala	43
4.1.5. Hemometrijska analiza stepena zasićenja zemljišta (EF)	44
4.1.6. X-ray difrakciona (XRD) i hemometrijska analiza mineralnog sastava zemljišta	46
4.1.7. Hemijski parametri zemljišta	49
4.2. Sadržaj metala u ispitanim biljnim vrstama	54
4.2.1. Hemometrijska analiza sadržaja metala u ispitanim biljkama	58
4.3. Hemometrijska analiza koeficijenata izmene elemenata (TC)	60
4.4. Hemometrijska analiza biokoncentracionog faktora elemenata (BF)	62
4.5. Etarska ulja	65
4.5.1. Hemijski sastav etarskog ulja <i>T. pulegioides</i>	65
4.5.2. Hemijski sastav etarskog ulja <i>T. glabrescens</i>	67
4.5.3. Hemijski sastav etarskog ulja <i>S. kitaibelii</i>	69
4.5.4. Hemijski sastav etarskog ulja <i>N. nuda</i>	71
4.5.5. Hemijski sastav etarskog ulja <i>L. montana</i>	73
4.5.6. Hemijski sastav etarskog ulja <i>P. longifolium</i>	75
4.5.7. Hemijski sastav etarskog ulja <i>P. officinale</i>	77
4.5.8. Hemijski sastav etarskog ulja <i>I. graveolens</i>	79
4.5.9. Hemometrijska analiza hemijskog sastava ulja na osnovu grupa jedinjenja	79
4.5.10. Hemometrijska analiza ulja na osnovu svih hemijskih komponenata	82
4.6. Antibakterijska aktivnost ispitanih supstanci	84
4.6.1. Hemometrijska analiza supstanci na osnovu MIC vrednosti	93
4.6.2. Hemometrijska analiza supstanci na osnovu MBC vrednosti	94
4.6.3. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema <i>T. pulegioides</i> ulje-antibiotik	95
4.6.4. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema <i>T. glabrescens</i> ulje-antibiotik	98

4.6.5. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema <i>S. kitaibelii</i> ulje-antibiotik	101
4.6.6. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema <i>N. nuda</i> ulje-antibiotik	103
4.6.7. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema <i>L. montana</i> ulje-antibiotik	106
4.6.8. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema <i>P. longifolium</i> ulje-antibiotik	108
4.6.9. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema <i>P. officinale</i> ulje-antibiotik ...	111
4.6.10. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema <i>I. graveolens</i> ulje-antibiotik	113
4.6.11. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema geraniol-antibiotik	116
4.6.12. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema timol-antibiotik	118
4.6.13. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema linalool-antibiotik	121
4.6.14. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema eukaliptol-antibiotik	123
4.6.15. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema geranil acetat-antibiotik	126
4.6.16. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema limonen-antibiotik	128
4.6.17. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema geraniol-monoterpenoid	130
4.6.18. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema timol-monoterpenoid	133
4.6.19. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema linalool-monoterpenoid	135
4.6.20. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema eukaliptol-monoterpenoid ...	138
4.6.21. Analiza antibakterijske aktivnosti sistema geranil acetat-monoterpenoid	141
4.6.22. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema limonen-monoterpenoid	141
4.6.23. Analiza antibakterijske aktivnosti sistema limonen-geranil acetat	144
4.6.24. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema supstanca-antibiotik-bakterijski soj	145
4.7. Akumulacija ispitivanih terpenoida i antibiotika u citoplazmatičnoj membrani	149
4.8. Molekularni doking na ćelijske receptore	152
4.8.1. Molekularni doking na receptore antibakterijske aktivnosti hloramfenikola	152
4.8.2. Molekularni doking na receptore antibakterijske aktivnosti teraciklina i streptomicina	155
4.8.3. Molekularni doking na važne receptore ćelijskog zida i citoplazmatične membrane	157
4.8.4. Molekularni doking na citohrom C oksidazu i ATP-sintazu	161
5. ZAKLJUČAK	167
6. LITERATURA	171
7. PRILOG	193
8. BIOGRAFIJA	212
9. IZJAVE AUTORA	214

1. UVOD

Primena lekovitih biljaka predstavlja nerazdvojni deo kulturne baštine čovečanstva. I pored vekovnog korišćenja biljaka u tradicionalnoj medicini, malo se znalo o njihovom hemijskom sastavu. Početkom XIX veka započinju naučna ispitivanja hemijskog sastava biljaka i izolovanje biološki aktivnih jedinjenja u čistom stanju. Poznavanje hemijskog sastava određene biljne vrste omogućava pronalaženje novih načina njene primene u raznim granama industrije, posebno u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Biljke sintetišu primarne i sekundarne metabolite pomoću jednostavnih molekula, među kojima značajno mesto zauzimaju neorganska jedinjenja. Istraživanje ekstraktibilnosti i rastvorljivosti hemijskih elemenata u zemljištu pomaže objašnjenju mehanizama apsorpcije, distribucije i akumulacije u biljnim organima. Osim toga, određene biljne vrste su izvor velikog broja elemenata koji su neophodni za optimalno funkcionisanje ljudskog organizma na biohemijskom nivou.

Antibiotici su supstance koje se dobijaju iz različitih vrsta mikroorganizama ili sintetičkim putem, a široko se primenjuju za lečenje bolesti uzrokovanih patološkim mikroorganizmima, kako kod ljudi, tako i kod životinja. Dobijeno je na stotine antibiotika, koji se međusobno značajno razlikuju u hemijskom sastavu, farmakološkim svojstvima, antibakterijskom spektru i mehanizmu dejstva. Faktor koji ograničava primenu antibiotika je znatna toksičnost, posebno u toku dugotrajne terapije i/ili lečenja visokim dozama. Rezistencija bakterija na sintetičke antibiotike poslednjih decenija smanjuje procenat izlečenja infektivnih bolesti u svetu. Imajući u vidu navedeno, neophodno je permanentno i sistematski tragati za novim antibakterijskim agensima i razmatrati nove metodološke pristupe. Etarska ulja, izolovana iz različitih biljnih organa su, u poređenju sa ostalim prirodnim proizvodima, bez svake sumnje potencijalno najbogatije nalazište prirodnih antibiotika.

Hemometrija je hemijska disciplina koja koristi matematičke i statističke metode, da oblikuje ili odabere optimalan postupak merenja ili eksperiment i omogući dobijanje maksimalnog broja informacija o analiziranom sistemu. U zavisnosti od načina postavke problema, tj. u zavisnosti od odabira promenljivih, hemometrijske metode i tumačenje korelacionih odnosa možemo primeniti na različitim sistemima, u cilju objašnjenja njihove povezanosti, sličnosti i razlika. Od nedavno se hemometrijske metode primenjuju u analizi ekosistema, u cilju objašnjenja distribucije i akumulacije pojedinih hemijskih elemenata u zemljištu i biljkama. Takođe se intenzivno proučava zavisnost hemijske strukture prirodnih i sintetičkih antibiotika i njihove farmakološke aktivnosti.

Hemometrijska analiza eksperimentalnih rezultata pokazaće značajnost genetskih i edafskih faktora za akumulaciju pojedinih elemenata u biljkama. Takođe ispitivanja će pokazati da li

je odnos nekih elemenata u zemljištu i biljci, konstantan i nepromenljiv ili međusobno uslovljen genetskom predispozicijom biljne vrste. Ovi rezultati biće od značaja za potpuniju karakterizaciju apsorpcije i akumulacije elemenata u proučavanim biljnim vrstama.

Sa aspekta proučavanja hemijskog sastava etarskih ulja i njihove antibakterijske aktivnosti suštinski zadatak ovog rada je razrada i primena hemometrijskih metoda za ispitivanje interakcije antibiotika i etarskih ulja i njihove kombinovane upotrebe u farmaceutskim formulacijama.

Izbor biljnih vrsta, koje su obrađene u ovoj studiji je učinjen nakon preliminarnih istraživanja koja su obuhvatila više od 20 biljnih vrsta. Kriterijumi za konačni izbor su bili sledeći: izbor samoniklih vrsta biljaka cvetnica koje akumuliraju etarska ulja; izbor vrsta istog roda sa istog i/ili različitih lokaliteta; izbor vrsta poznatih po značajnoj antibakterijskoj aktivnosti; izbor vrsta koje nisu opisane u literaturi kao potencijalni izvor antibakterijskih agenasa. Imajući u vidu navedene kriterijume, izabrano je 8 biljnih vrsta sa 6 lokaliteta. Familija Lamiaceae: *Thymus glabrescens* Willd., *Thymus pulegioides* L., *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., *Nepeta nuda* L.; familija Apiaceae: *Libanotis montana*, *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit., *Peucedanum officinale* L. i familija Asteraceae: *Inula graveolens* L.

Polazeći od hipoteze da bi odabrane biljne vrste mogle biti korišćene kao sirovine za farmaceutsku i prehrambenu industriju, preduzeta su detaljna hemijska, mikrobiološka i hemometrijska istraživanja.

- Hemijska ispitivanja obuvataju:
 - Određivanje sadržaja metala: Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu i Zn, u zemljištu i odabranim biljkama.
 - Hemijska analiza mineralnog sastava zemljišta.
 - Određivanje hemijskih parametara zemljišta (kiselost, elektrojni potencijal, električna provodljivost, katjonski izmenjivački kapacitet zemljišta i sadržaj organske materije).
 - Izolovanje i analiza etarskih ulja.
- Biološka ispitivanja obuvataju:
 - Određivanje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja, čistih jedinjenja (dominantnih komponenata etarskih ulja) i odabranih antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin, streptomycin).
 - Proučavanje antibakterijske aktivnosti interakcija: etarsko ulje-antibiotik, čisto jedinjenje-antibiotik i čisto jedinjenje-čisto jedinjenje.

- Hemometrijska analiza obuvata:
 - Primena selektivne jon analize (SIA) kao metode u spektroskopskoj analizi hromatograma izolovanih etarskih ulja.
 - Formiranje baze podataka sa promenljivima.
 - Klasifikaciju ispitivanih sistema na osnovu odabranih promenljivih.
 - Primena hemometrijskih metoda, analize glavnih komponentata (PCA) i klaster analize (HCA) u klasifikaciji zemljišta i odabranih biljnih vrsta.
 - Primena hemometrijskih metoda PCA i HCA u ispitivanju odnosa hemijske strukture komponentata etarskog ulja i njihove antibakterijske aktivnosti.
 - Primena hemometrijskih metoda PCA i HCA u istraživanju interakcija etarskih ulja i antibiotika.
 - Određivanje termodinamičkih parametara komponentata etarskog ulja i diskusija mogućih mehanizama njihovog delovanja primenom molekularnog dokinga (SAR metoda).

2. OPŠTI DEO

2.1. Biogeni elementi u biljkama

Nosioci farmakološke aktivnosti medicinskih biljaka su primarni i sekundarni metaboliti, pri čemu treba istaći da neorganske komponente mogu značajno uticati na povećanje terapijskog potencijala (Yemane et al., 2008; Subramanian et al., 2012).

Određeni hemijski elementi su esencijalni za rast biljaka dok, s druge strane, njihove visoke koncentracije mogu delovati štetno (En et al., 2003). Uloga i značaj metala u biljci u velikoj meri zavisi od njihove koncentracije (Bennett et al., 2000; Kabata-Pendias, 2010). Metali imaju višestruku ulogu u životu biljaka, neke od najvažnijih su da ulaze u sastav brojnih organskih jedinjenja, direktno utiču na osmotski potencijal ćelija, učestvuju u katalizi biohemijskih procesa, deo su mehanizma zaštite od virusa, a to znači da posredno ili neposredno učestvuju u svim životnim procesima biljke (Miladinović et al., 2011a). Usvajanje elemenata u biljkama je regulisano nizom faktora, koji zavise od same vrste (genetska predispozicija, osobine korenovog sistema, osobine lista) ali i od staništa (hemijski i mineralni sastav zemljišta, kiselost, sadržaj kiseonika i organske materija u zemljištu, uzajamno dejstvo jona) (Sparks, 2003; Kabata-Pendias, 2010). Primenom hemometrijskih metoda pokušaćemo uočiti mehanizme akumulacije Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu i Zn u odabranim biljnim vrstama i dati odgovor koji od navedenih faktora je odgovoran za takvo ponašanje. Ovi rezultati biće od značaja za potpuniju karakterizaciju apsorpcije i akumulacije elemenata u određenim biljnim vrstama.

Kod većine biljaka natrijum nije esencijalni element, već se karakteriše kao koristan hemijski element. On se može smatrati esencijalnim samo kod nekih C_4 biljaka (*Atriplex spp.*, *Kochia childsii*), gde je odgovoran za unos piruvata u hloroplaste pomoću Na^+ -piruvat kotransportera (Furumoto et al., 2011). Jon Na^+ ima vrlo važnu ulogu u biljkama, posebno u uslovima deficita jona kalijuma. Istraživanja su pokazala da nedovoljna količina kalijuma u zemljištu, uslovljava veći unos natrijuma (Subbarao et al., 2003). Takođe je pokazano da halofite biljke koje rastu na slanom zemljištu (*Suaeda maritima* i *Salicornia spp.*) pokazuju intenzivan rast u prisustvu visokih koncentracija Na^+ jona. Pri niskim koncentracijama, Na^+ ne samo da je bezopasan već može biti veoma koristan u uslovima niske koncentracije K^+ , imajući u vidu činjenicu da su odgovarajuće hidratne forme K^+ i Na^+ jona strukturno i hemijski vrlo slične (Amtmann & Sanders, 1999). Na osnovu ovoga možemo zaključiti da uloga K^+ u procesima biljne ćelije može biti zamenjena Na^+ jonom. Međutim ovo ne treba generalizovati i primenjivati na enzime u kojima K^+ ima ulogu kofaktora. Istraživanja su pokazala da različite veličine jonskih radijusa, uslovljavaju različite energije vezivanja i različitu kordinaciju ova dva metala sa biomolekulima (Lindhauer & De Fekete, 1990).

Kalijum je najzastupljeniji katjon u biljnoj ćeliji. Brojne studije ispituju fiziološku ulogu K^+ u biljci (Anschütz et al., 2014; Demidchik, 2014), njegovu apsorpciju iz zemljišta (Nieves-Cordones et al., 2014), kao i njegovu distribuciju kroz različite delove biljke (Wigoda et al., 2014). Pojedine studije se bave proučavanjem izmene K^+ jona Na^+ jonom, usled povećanog saliniteta zemljišta. Na osnovu prethodnih istraživanja uočava se značaj kalijuma u metabolizmu skroba, procesu fotosinteze, apsorpciji vode, sintezi proteina, aktivaciji enzima, kao i povećanju otpornosti biljke na bolesti i hladnoću (Benito et al., 2014).

Magnezijum je jedan od devet esencijalnih makronutrijenata značajan za rast i reprodukciju biljaka (Williams & Salt, 2009), sastavni je deo hlorofila i kofaktor više od 300 enzima (karboksilaze, fosfataze, kinaze, RNA-polimeraze i ATP-aze). Približno 3/4 magnezijuma u listu biljaka je odgovorno za sintezu proteina, 1/5 se nalazi u obliku hlorofila dok je ostatak smešten u vakuolama (Karley & White, 2009). Magnezijum ima veliki hidratacioni radijus, što uslovljava njegovo slabo adsorbovanje na koloidnim česticama zemljišta u uslovima njene velike kiselosti i malog katjonsko-izmenjivačkog kapaciteta (Grzebisz, 2011). Visoke koncentracije Ca^{2+} , Na^+ i K^+ jona u zemljištu kao i visoka pH vrednost, može smanjiti dostupnost magnezijuma biljci (Broadley & White, 2010). Nedostatak magnezijuma utiče na rast i produktivnost biljaka čija je posledica hloroza listova (Ruan et al., 2012). Toksičnost magnezijuma može biti uočena kod biljnih vrsta koje rastu u sušnim predelima (Hawkesford et al., 2012). Literaturni podaci ukazuju da se sadržaj magnezijuma u biljci kreće u intervalu od 268 ppm do 24005 ppm sa prosečnom koncentracijom u listu od 3300 ppm (Watanabe et al., 2007). Neke studije su povezale ove rezultate sa prosečnim sadržajem magnezijuma u organizmu (390 ppm) u cilju nutritivne primene ispitanih biljaka (Salter et al., 2012).

Kalcijum je esencijalan makronutrijent, čija se koncentracija u citoplazmi biljne ćelije mora održavati niskom, zbog potencijalne toksičnosti (Marschner, 2012). Kalcijum učestvuje u prenosu ćelijskih signala i ima važnu ulogu u zaštiti biljke u uslovima biotskog i abiotskog stresa. Urađene studije ističu značaj kalcijuma u formiranju i deobi biljne ćelije, biljnoj respiraciji, metabolizmu azota i podsticanju antimikrobne aktivnosti biljke (Yang & Pooviah, 2002).

Mangan je esencijalni mikronutrijent biljke koji učestvuje u mnogim metaboličkim procesima. Uloga mangana u biljkama je detaljno ispitana od strane brojnih autora (Millaleo et al., 2010; Kabata-Pendias, 2010). Njegov značaj je uočen u oksido-redukcionim procesima, sintezi hlorofila i fotosintezi. Pokazano je da utiče na dostupnost kalcijuma i fosfora, a takođe je i sastavni deo enzima arginaze i fosfotransferaze. Pri većim koncentracijama može biti toksičan za biljku, što se manifestuje oksidativnim stresom i smanjenjem biljne mase. Neke

od studija su ispitale izmenu mangana između biljke i zemljišta i zaključile da kisela zemljišta niskog elektrodnog potencijala su glavni uzrok toksičnosti mangana (Kogelmann & Sharpe, 2006). Takođe, su proučavani sistemi biljne zaštite u uslovima povećane koncentracije mangana (Tewari et al., 2013).

Metabolizam gvožđa u biljkama je sistematski izučen i pouzdano se zna da je gvožđe neophodan element za dobijanje energije u ćeliji (Kabata-Pendias, 2010; Salter et al., 2012). Sa biohemijškog aspekta značaj gvožđa u biljci je veliki: a) proteini gvožđa (transferin i feritin) kao i siderofore imaju važnu ulogu u skladištenju i transportu supstanci, b) gvožđe je sastavni deo hem-proteina, c) učestvuje u formiranju hlorofila, d) kompleksi gvožđa i biomolekula imaju važnu ulogu u transportu elektrona, e) pojedini proteini gvožđa su odgovorni za redukciju nitrata i sulfata, f) gvožđe učestvuje u metabolizmu nukleinskih kiselina, g) Fe^{2+} i Fe^{3+} joni imaju katalitičku ulogu u brojnim reakcijama. Nedostatak gvožđa utiče na rast i produktivnost biljaka a zavisi od sastava zemljišta, genetske predispozicije biljne vrste, klimatskih faktora kao i vegetacionog stadijuma biljke (Ozores-Hampton, 2013). S druge strane, visok sadržaj gvožđa u zemljištu niske pH vrednosti, može imati toksične posledice po biljku, čiji je ishod sličan njegovom deficitu (Hodson, 2012; Elec et al., 2013). Utvrđeno je da su pojedine biljne vrste tolerantne na visok sadržaj gvožđa, što se najčešće objašnjava oksidacijom, imobilizacijom i uklanjanjem gvožđa putem korenovog sistema (Kabata-Pendias, 2010). Pokazano je da gvožđe u biljci može reagovati sa različitim elementima čiji je efekat uglavnom antagonistički, a rezultat može biti pozitivan ili negativan po biljnu vrstu (Meda et al., 2007; Kabata-Pendias, 2010).

Bakar, esencijalni mikronutrijent biljaka, ulazi u sastav brojnih enzima koji učestvuju u procesima respiracije i fotosinteze. On ima važnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata i nitrata, apsorpciji vode, reprodukciji biljaka kao i njihovoj zaštiti od bolesti (Salter et al., 2012). Nedostatak bakra, slično već opisanim elementima, utiče na rast i razviće biljaka a zavisi od vrste zemljišta, klimatskih uslova i genetske predispozicije biljne vrste (Kabata-Pendias, 2010). Na osnovu brojnih studija je utvrđeno da visoke koncentracije bakra u biljci mogu biti štetne po nju a toksičnost se ogleda u sledećem: a) oštećenje i izduživanje ćelija korenovog sistema, b) uticaj na permeabilnost K^+ i PO_4^{3-} jona u ćelijskoj membrani, c) peroksidacija lipida u hloroplastima i inhibicija transporta elektrona, d) oštećenje DNA i inhibicija fotosinteze (Zvezdanović et al., 2007; Chaffai et al., 2007). Pokazano je da bakar u biljci može reagovati sa različitim elementima čiji je efekat uglavnom antagonistički, a rezultat može biti pozitivan ili negativan po biljnu vrstu (Kabata-Pendias, 2010).

Cink je sastavni deo mnogih enzima (dehidrogenaze, proteinaze, fosfataze, fosfohidrolaze) i ima važnu ulogu u metaboličkim procesima biljke. Pojedina istraživanja su pokazala značaj cinka u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina, fosfata kao i ulogu u formiranju auksina, RNA i ribozoma (Kabata-Pendias, 2010; Salter et al., 2012). Uočeno je da se nedostatak cinka u biljci javlja usled: a) niske koncentracije Zn u zemljištu, b) male količine organske materije u zemljištu, c) visoke vrednosti pH zemljišta, d) mikrobne inaktivacije cinka, e) klimatskih faktora i genetske predispozicije biljnih vrsta, f) antagonističkih interakcija sa ostalim metalima u biljci (Kabata-Pendias, 2010). Fitotoksičnost cinka i tolerantnost biljnih vrsti na cink je predmet brojnih studija (Beyer et al., 2013, Gomes et al., 2013; Yang et al., 2014). Bez obzira da li se radi o nedostatku ili višku cinka u biljci, ishod je identičan prethodno opisanim elementima.

Pregledom dostupnih literaturnih podataka, nismo našli potvrdu da je do sada ispitivan hemijski i mineralni sastav zemljišta sa odabranih lokaliteta, kao i akumulacija navedenih metala u selektovanim biljnim vrstama.

2.2. Etarska ulja

Etarska ulja su smeše terpenoida, koji su rasprostranjeni u velikom broju biljnih familija: Lamiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae i druge. Etarska ulja se odlikuju mirisom (većinom prijatnim) i specifičnim sastavom terpenoida. Osnovni sastav etarskih ulja čine monoterpeni i seskviterpeni. Na osnovu tipa funkcionalne grupe monoterpeni se mogu podeliti na: ugljovodonike, okside, alkohole, aldehide, ketone, kiseline, estre, laktone i fenole. Na osnovu građe ugljenikovog skeleta mogu se podeliti na aciklične, aliciklične, aromatične i heterociklične. Moguća je dalja podela monoterpena na aciklične, monociklične i biciklične (Miladinović, 2011b).

Etarska ulja su uglavnom lako pokretljive tečnosti, koje mogu nastati aktivnošću endogenih biljnih tkiva (uljne ćelije, sekretorne šupljine, sekretorni kanali) ili aktivnošću egzogenih sekretornih tkiva (žlezdane dlake). Količina i sastav etarskih ulja u biljkama zavisi od genotipa biljne vrste, ekoloških faktora, fenofaza ontogenetskog razvića, načina obrade biljne sirovine i načina izolovanja etarskog ulja.

Etarska ulja su lipofilnog karaktera, dobro se rastvaraju u nepolarnim organskim rastvaračima, koncentrovanom i apsolutnom etanolu i masnim uljima. Rastvorljivost u razblaženom etanolu zavisi od koncentracije etanola i vrste etarskog ulja. Primenuju se u medicini, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, kulinarstvu i poljoprivredi. U okviru medicine i farmacije etarska ulja se koriste kao antiseptici, sedativi, ekspektoransi, antiflogistici, karminativi, stomahici, holagozi, korigensi, diuretici i rubefacijensi (Worwood, 1993).

2.2.1. Literaturni pregled hemijskih i bioloških istraživanja terpenoida, odabranih biljnih vrsta

Određeni broj studija se bavio analizom i ispitivanjem etarskog ulja biljne vrste *T. pulegioides* sa različitih područja (Michet et al., 2008; Radonić & Mastelić, 2008; Rădulescu et al., 2009; Pavel et al., 2010; Miladinović et al., 2013). Takođe je proučavana i antibakterijska aktivnost etarskog ulja *T. pulegioides* (Pinto et al., 2006; De Martino et al., 2009; Pavel et al., 2010; Tekoriene & Ložiene, 2012). Pojedine studije su se bavile proučavanjem antifungalne aktivnosti etarskog ulja *T. pulegioides*. Autori su konstatovali da etarsko ulje ove biljne vrste ispoljava značajnu antifungalnu aktivnost usled lize citoplazmatične membrane i uticaja na smanjen sadržaj ergosterola (Pinto et al., 2006).

Izvestan broj studija bavio se analizom i ispitivanjem hemijskog sastava etarskog ulja *T. glabrescens* (Maksimović et al., 2008; Pluhár et al., 2008; Pavel et al., 2010; Pluhár et al., 2012, Ilić et al., 2014). Geraniol je glavna komponenta etarskog ulja *T. glabrescens* iz Rumunije (Pavel et al., 2010). Seskviterpeni (germakren D, β -kariofilen, kariofilen oksid) činili su glavne komponente etarskog ulja *T. glabrescens* iz Mađarske (Simkó et al., 2013). Nešto manji broj studija bavio se ispitivanjem antibakterijske aktivnosti etarskog ulja ove biljne vrste (Pavel et al., 2010; Toroglu, 2011). Slično ulju *T. pulegioides*, prva istraživanja kombinovane interakcije ulja *T. glabrescens* sa antibioticima objašnjeni su u publikaciji Ilić et al. (2014).

Određeni broj studija se bavio proučavanjem hemijskog sastava etarskog ulja *S. kitaibelii* (Chalchat et al., 1999; Slavkovska et al., 2001; Konakchiev & Tsankova, 2002; Miladinović, 2005; Mihajilov-Krstev et al., 2011; Kundaković et al., 2011). Antibakterijska aktivnost etarskog ulja *S. kitaibelii*, je ispitana u studiji Mihajilov-Krstev et al. (2011). Autori su ispitali više od 30 bakterijskih sojeva i konstatovali da etarsko ulje *S. kitaibelii* predstavlja izvanredan prirodan antibakterijski agens koji može imati potencijalnu primenu u lečenju kožnih infekcija ili kao konzervans u prehrambenoj industriji. Citotoksična i antibakterijska aktivnost metanolnog ekstrakta ove biljne vrste je ispitana u studiji Stanojković et al. (2013). Autori su uočili izraženu citotoksičnu aktivnosti na ćelijama Fem-x malignog melanoma, dok je umerena citotoksična aktivnost zapažena na estrogen zavisnim kancer ćelijama tipa MDA-MB-361.

Hemijski sastav etarskog ulja *N. nuda* je publikovan u određenom broju istraživačkih projekata (Kökdil et al., 1996; Sarer & Konuklugil, 1996; Mancini et al., 2009; Gkinis et al., 2010; Kilic et al., 2011; Radulović et al., 2011; Bozari et al., 2013; Gormez et al., 2013). Pojedina istraživanja su pokazala da je glavna komponenta *N. nuda* ulja $4\alpha,7\alpha,7\alpha$ -

nepetalakton (Kökdil et al., 1996; Bozari et al., 2013; Gormez et al., 2013). Određene studije govore o nepetalaktonu i eukaliptolu kao dominantnim komponentama *N. nuda* ulja (Gkinis et al., 2010; Radulović et al., 2011). Literaturni podaci ukazuju na dominaciju eukaliptola, nerolidola i kamfora (Sarer & Konuklugil, 1996; Kilic et al., 2011). Takođe rezultati istraživanja govore o antibakterijskom i antikancerogenom dejstvu etarskih ulja i ekstrakata ove biljne vrste (Kirmizibekmez et al., 2011; Bozari et al., 2013; Yildirim et al., 2013; Gormez et al., 2013).

Analiza i ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja *L. montana* je predmet malog broja studija (Ozturk & Ercisli, 2006; Masoudi et al., 2006; Kapetanos et al., 2008; Skalicka-Wozniak et al., 2010). Ispitivanje etarskog ulja ove biljne vrste iz Poljske ukazalo je na visok sadržaj sabinena i β -felandrena (Skalicka-Wozniak et al., 2010). Osim naših rezultata (Miladinović et al., 2014), literaturni pregled nije pružio podatke o antibakterijskoj aktivnosti etarskog ulja *L. montana*.

Postoje veoma oskudni podaci o analizi i ispitivanju hemijskog sastava etarskog ulja *P. longifolium* (Kapetanos et al., 2008; Tepe et al., 2011). U etarskom ulju *P. longifolium* iz Turske seskviterpeni su dominantna klasa jedinjenja, sa najvišim sadržajem 8-kedren-13-ola (Tepe et al., 2011). Mali broj studija je proučavao antibakterijska i antioksidantna svojstva ekstrakata biljne vrste *P. longifolium* (Tepe et al., 2011; Matejić et al., 2013).

Analiza i ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja *P. officinale* je predmet samo nekolicine studija (Jaimand et al., 2006; Kapetanos et al., 2008; Figuérédo et al., 2009). U etarskom ulju *P. officinale* iz Irana, utvrđen je visok procenat monoterpena fenčona (Jaimand et al., 2006). Slično etarskom ulju izolovanom iz *P. longifolium*, izvestan broj studija je proučavao antibakterijska, antioksidantna i histohemijska svojstva ekstrakata biljne vrste *P. officinale* (Roman et al., 2011; Matejić et al., 2013).

Analiza i ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja *I. graveolens* je opisan u istraživanjima Blanc et al., 2004; Dohi et al., 2009; Djenane et al., 2012; Boudouda et al., 2013. Hemijski sastav ispitanog ulja je vrlo sličan etarskom ulju *I. graveolens* sa područija Korzike, Alžira i Francuske (Blanc et al., 2004; Dohi et al., 2009; Boudouda et al., 2013). Sva navedena ulja sadrže visok procenat borneola, bornil acetata i τ -kadinola. Određeni broj studija se bavio antibakterijskim, citotoksičnim, antioksidantnim i acetilholinesteraza-inhibitornim dejstvom etarskih ulja i ekstrakata ove biljne vrste (Topçu et al., 1993; Dohi et al., 2009; Guinoiseau et al., 2010; Omezzine et al., 2011; Al-Fartosy, 2011).

2.2.2. Antibakterijska aktivnost etarskog ulja

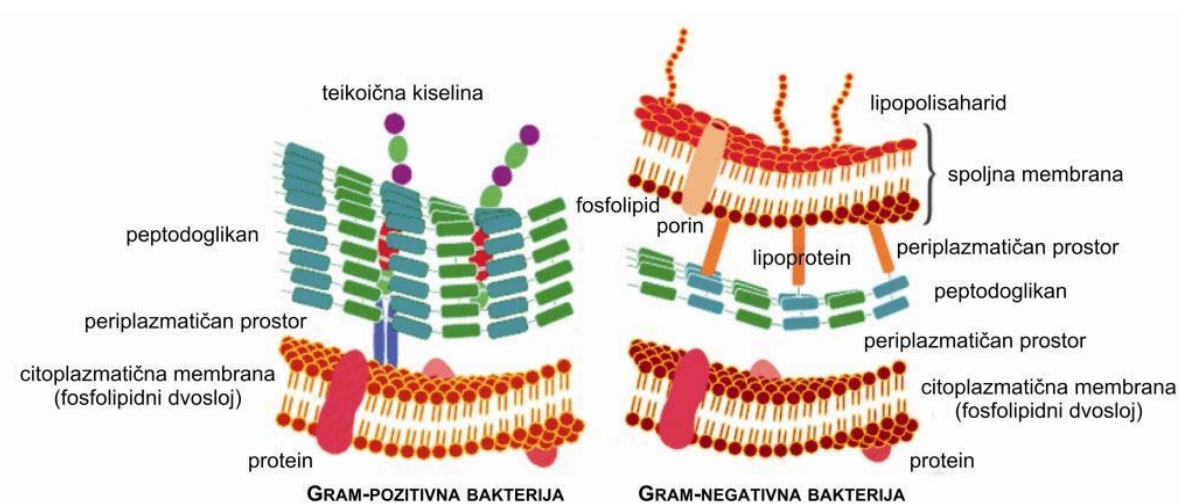
Sintetički antibiotici (hloramfenikol, tetraciklin, streptomycin i ostali) su od svog otkrića u dvadesetom veku, značajno uticali na smanjenje rizika od nastanka infektivnih bolesti. Rezistencija bakterija na sintetičke antibiotike poslednjih decenija značajno smanjuje procenat izlečenja u celom svetu. Poznati su primeri rezistencije *E. coli* na treću generaciju cefalosporina, zatim pojava vankomicin-rezistentnih *S. aureus* i multirezistentne *P. aeruginosa* (Tenover, 2006). Imajući u vidu navedeno, neophodno je permanentno i sistematski tragati za novim antibakterijskim agensima, a etarska ulja su bez svake sumnje potencijalno najbogatije nalazište prirodnih antibiotika. Poznato je da terpenoidi, konstituenti etarskih ulja delimično ili potpuno inhibiraju rast bakterija (Griffin et al., 1999). U cilju ispitivanja antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i njihove kombinovane primene sa antibioticima, kao i davanja odgovora na moguć mehanizam njihovog dejstva, izvršena je detaljna hemijska analiza.

2.2.2.1. Strukturna građa bakterija

Da bi smo objasnili antibakterijske efekte etarskih ulja i njihovih dominantnih komponenata u kombinaciji sa antibioticima, potrebno je detaljno opisati strukturnu građu bakterija i farmakološke osobine korišćenih antibiotika. Osnovni cilj svih antibakterijskih lekova jeste selektivna toksičnost. Pod selektivnom toksičnošću se podrazumeva ciljano uništavanje bakterija (baktericidni agensi) ili inhibicija njihovog rasta ili deljenja (bakteriostatički agensi), usled različite strukturne građe patogena u odnosu na ćelije domaćina. Za razliku od eukariotskih ćelija, prokariotski organizmi (bakterije) nemaju ćelijsko jedro i organele (osim ribozoma), a njihova funkcija pokrivena je aktivnošću ćelijskog zida i citoplazmatične membrane.

2.2.2.2. Struktura i funkcija ćelijskog zida bakterije

Pod ćelijskim zidom bakterije, podrazumevaju se sve komponente koje pokrivaju citoplazmatičnu membranu, tj. leže van citoplazmatične membrane čineći omotač oko ćelije. Zid bakterije funkcioniše kao omotač koji mehanički štiti protoplast, daje oblik bakterijama, ali sadrži na spoljnoj strani i mesta za adsorpciju bakteriofaga, mesta za prepoznavanje i transport određenih supstanci, kao i mesta odgovorna za prepoznavanje i kontakt ćelija-ćelija. Prema načinu bojenja po Gram-u, sa bojama kristal-violet i šafraninom, bakterije se dele na Gram-pozitivne i Gram-negativne, što reflektira i različitost njihovih zidova (Slika 1). Mnoge Gram-pozitivne bakterije imaju relativno prost ćelijski zid debljine od 15-50 nm. Glavni konstituent je polimer, koji se sastoji od dve komponente međusobno kovalentno povezane. Jedna komponenta je polisaharid peptidoglikan (čineći 50% mase ćelije), dok je druga komponenta najčešće kiseli polimer - teikoična kiselina (čini 30-40% mase ćelije).



Slika 1. Šematski prikaz strukture ćelijskog zida i citoplazmatske membrane Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Teikoična kiselina je relativno kratak polimer (sačinjen od približno 30 ostataka glicero-3-fosfata), koja se može povezati sa citoplazmatičnom membranom u formi lipoteikoične kiseline. Zid Gram-pozitivnih bakterija je višeslojne strukture, gde se polimeri međusobno povezuju kako horizontalno tako i vertikalno, čineći mrežastu strukturu. Ova struktura omogućava da Gram-pozitivne bakterije imaju visok osmotski potencijal (do 20 att). Druge komponente ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija, variraju u znatnoj meri od vrste bakterija. Proteini predstavljaju 5-10% ukupne mase zida i zajedno sa polisaharidima se nalaze na spoljnoj strani zida determinišući antigene ovih bakterija. Za razliku od Gram-negativnih bakterija, Gram-pozitivne u ćelijskom zidu nemaju lipopolisaharide, lipoproteine i fosfolipide (Slika 1). Zid Gram-negativnih bakterija je daleko složenije strukture u odnosu na Gram-pozitivne, a sastoji se od peptidoglikana i spoljne membrane. Peptidoglikan leži iznad citoplazmatske membrane, ali je daleko tanji (2 nm) u poređenju sa istom strukturom Gram-pozitivnih bakterija. On čini svega 5% mase zida, ali i pored toga doprinosi jačini zida Gram-negativnih bakterija, koje imaju osmotski potencijal od oko 6 att. Prostor između plazmatske membrane i peptidoglikanskog sloja naziva se periplazmatičan prostor (Slika 1). Spoljna membrana (debljine od 6-10 nm) je strukture po građi slična citoplazmatskoj membrani, nalazi se iznad peptidoglikana i predstavlja složeni dvosloj lipida. Osim strukturne sličnosti, spoljna membrana se značajno razlikuje od citoplazmatske membrane po funkcionisanju i sastavu makromolekula koji ulaze u njen sastav. U strukturu spoljne membrane ulaze: a) lipopolisaharidi, b) lipoproteini, c) proteini i d) fosfolipidi. U spoljnom sloju spoljne

membrane nalaze se lipopolisaharidi i proteini, a u unutrašnjem sloju se nalaze fosfolipidi i lipoproteini (Slika 1).

Struktura lipopolisaharida je veoma kompleksna a sastoji se od O-antigena (polisaharidnog lanca) i lipida A (fosforilovan disaharid glukozoamina). Jedna je od glavnih komponenata ćelijskog zida, odgovorna za očuvanje integriteta bakterije i zaštite od bilo kakvog neželjenog hemijskog uticaja. Lipopolisaharidi povećavaju negativno naelektrisanje spoljne membrane, čineći je nepropustljivom za difuziju mnogih hidrofobnih molekula. U potrazi za odgovorom kombinovanog dejstva etarskih ulja i antibiotika, metodom molekularnog dokinga ispitan je LptA protein. LptA je esencijalan periplazmatični protein važan u transportu lipopolisaharida iz citoplazmatične ka spoljnoj membrani Gram negativnih bakterija (Suits et al., 2008). Njegova inhibicija određenim komponentama etarskog ulja mogla bi objasniti smanjenu rezistentnost Gram-negativnih bakterija na antibiotike i sinergističke efekte ispitanih smeša.

Lipoproteini su mali alifatični molekuli sa proteinskim delom od 58 aminokiselina, koji na C-terminalnom kraju imaju lizin a na N-kraju cistein. Oni omogućavaju povezivanje spoljne membrane sa peptidoglikanom, a locirani su u unutrašnjem delu membrane (Slika 1).

Dva tipa proteina ulaze u sastav spoljne membrane: proteini odgovorni za transport specifičnih molekula i grupa transmembranskih proteina (locirani u oba sloja membrane). Transmembranski proteini su znatno zastupljeniji u spoljnoj membrani. To je grupa kiselih proteina molekulske mase od 32-38 kD i nazivaju se porini. Porini formiraju kanale, odnosno hidrofilne pore kroz hidrofobni lipidni dvosloj spoljne membrane Gram-negativnih bakterija, kroz koje mogu nespecifično difundovati mali hidrofilni molekuli. Pojedina istraživanja su pokazala da mutacije koje dovode do prestanka sinteze ili dovode do sinteze izmenjenih porina, obično čine te bakterije rezistentnim na antibiotike (hloramfenikol, tetraciklin) koji koriste hidrofilne pore za transport kroz spoljnu membranu (Anderson et al., 2012).

Fosfolipidi spoljne membrane su uglavnom fosfatidiletanolamin i fosfatidilglicerol i po strukturi su istovetni sa istim molekulima u citoplazmatičnoj membrani.

2.2.2.3. Struktura i funkcija citoplazmatične membrane

Membrane su lipoproteinske makromolekularne strukture, jer u njihov sastav ulaze različite varijante lipida i proteina. Na osnovu pojedinih studija pokazano je da je sastav citoplazmatičnih membrana sledeći: lipidi 6-37%, proteini 40-85%, heksoze 0.2-19% i RNA 0.8-15%, računajući na suhu težinu membrana. Lipidi koji ulaze u sastav bakterijskih membrana su uglavnom fosfolipidi, mala količina neutralnih lipida, glikolipidi i slobodne masne kiseline. Na osnovu fluidno-mozaičnog modela, citoplazmatična membrana je izgrađena od dva sloja fosfolipida. Napolarni, hidrofobni krajevi fosfolipida su okrenuti jedan

prema drugom i zahvaljujući hidrofobnim interakcijama održavaju dvoslojnu strukturu membrane. Polarni, hidrofilni, krajevi fosfolipida su okrenuti ka spoljašnosti i u interakciji sa vodom stabilizuju dvoslojnu strukturu. Proteini su uronjeni u fosfolipidni dvosloj, a najveći antibiotski značaj imaju integralni proteini, koji ostvaruju kontakte sa obe strane membrane i prostiru se kroz oba sloja fosfolipida (Slika 1). Mobilnost fosfolipida i proteina u citoplazmatičnoj membrani je važan faktor koji može pomoći razumevanju delovanja nekih antibiotika na citoplazmatičnu membranu.

Membrana je osmotska barijera između spoljne sredine i unutrašnjosti ćelije, koja je permeabilna za vodu. Druge supstance mogu prolaziti kroz membranu zahvaljujući specijalnim mehanizmima koji se razlikuju od ćelije do ćelije. Membranski transportni proteini omogućavaju selektivan prolaz različitih polarnih molekula u vidu uniportnog ili kotransportnog (simport/antiport) prenošenja.

Transport kroz membranu se može odvijati na tri načina:

Pasivna (prosta) difuzija. Supstance difunduju kroz membranu u smeru gradijenta koncentracije ili naelektrisanja. Za ovakav transport, supstance moraju biti dovoljno rastvorljive u hidrofobnom delu membrane da bi mogle biti transportovane. Difuzija se može odvijati i kroz vodene pore u membrani za hidrofilne supstance. U oba slučaja, koncentracija unutar ćelije ne sme da prevazilazi koncentraciju iste supstance van ćelije, jer u suprotnom neće doći do difuzije.

Olakšana difuzija. Supstance koje su nerastvorljive u hidrofobnom delu membrane, ali su u stanju da reaguju sa nosačem lociranim u membrani (protein po prirodi), mogu biti transportovane tako što formiraju kompleks sa nosačem i tako se prenose do unutrašnje strane membrane, gde se oslobađaju u citoplazmu.

Aktivan transport (transport zavistan od energije). Ovaj transport je neophodan za supstance koje nisu u stanju da se unose u ćeliju na gore pomenute načine. U prisustvu ATP-a dolazi do transporta, koji obavezno uključuje molekul nosača, a transport se može odigravati i nasuprot gradijenta koncentracije. Pojedine studije su pokazale da je unos streptomcina u citoplazmu ATP dirigovan za razliku od tetraciklina koji može u citoplazmu dospeti i prostom difuzijom (Anderson et al., 2012). Ova istraživanja su pokazala i da je ulazak hloramfenikola u citoplazmu isključivo posledica pasivne difuzije. Ove konstatacije nam mogu pomoći u objašnjenju kombinovanog dejstva etarskih ulja i antibiotika. Na osnovu mehanizma dejstva pojedinih antibiotika i načina njihovog delovanja na citoplazmatičnu membranu, antibakterijske agense možemo podeliti: a) supstance koje izazivaju dezorganizaciju membrane, b) supstance koje formiraju vodene pore u membrani, c) supstance koje izazivaju

specifične promene u permeabilnosti katjona, d) supstance koje inhibiraju enzime u membrani. Zajednički rezultat dejstva svih ovih supstanci jeste gubljenje funkcionalnosti citoplazmatične membrane usled narušavanja organizacije membrane, tako da membrana ne može više kontrolisati transport pojedinih molekula, što dovodi do naglog gubljenja malih molekula iz bakterijske ćelije i uginuća bakterije. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja objašnjava se na identičan način, u vidu strukturnih promena i perforacije ćelijskog zida i membrane što se manifestuje lizom ćelija (Sikkema et al., 1995; Trombetta et al., 2005, Stanković et al., 2011, Miladinović et al., 2014; Ilić et al., 2014).

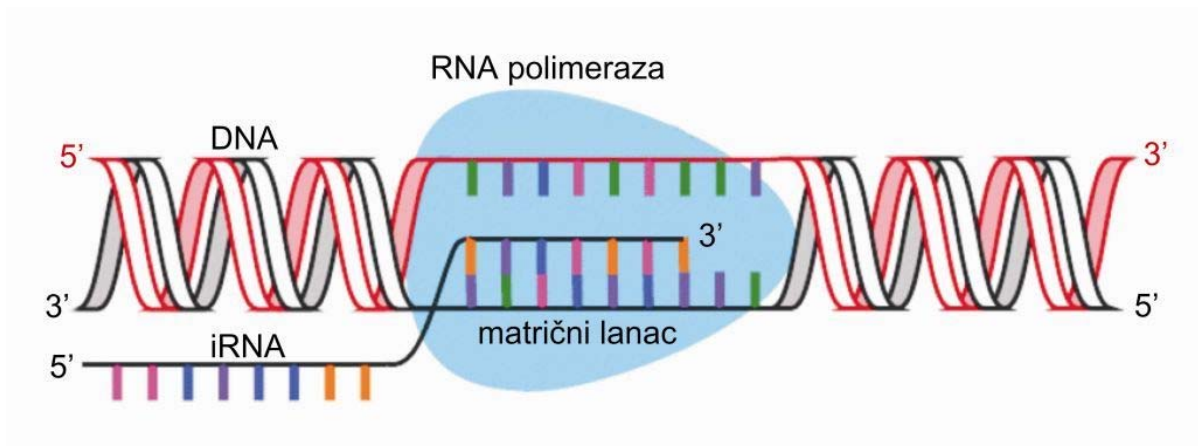
2.2.2.4. Sinteza proteina i njeni inhibitori

Mnogi antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina (translaciju), poseduju svojstva bitna za primenu antibiotika u terapiji, a to je visoko specifično inhibitorno delovanje na senzitivne ćelije. Tako postoje kategorije antibiotika koji isključivo deluju na bakterijske ćelije, a ne deluju na eukariotske ćelije i obrnuto. Najveći broj inhibitora sinteze proteina ostvaruje svoje delovanje vezivanjem za ribosome senzitivnih organizama što rezultira u inhibiciji njihove funkcije na različitim stupnjevima sinteze proteina. Mehanizam sinteze proteina u bakterijama je dobro izučen i ovde će biti date samo neke osnovne postavke, koje će omogućiti lakše praćenje mehanizma hloramfenikola, tetraciklina i streptomocina na ovaj proces.

Sinteza proteina se sastoji iz sledećih faza:

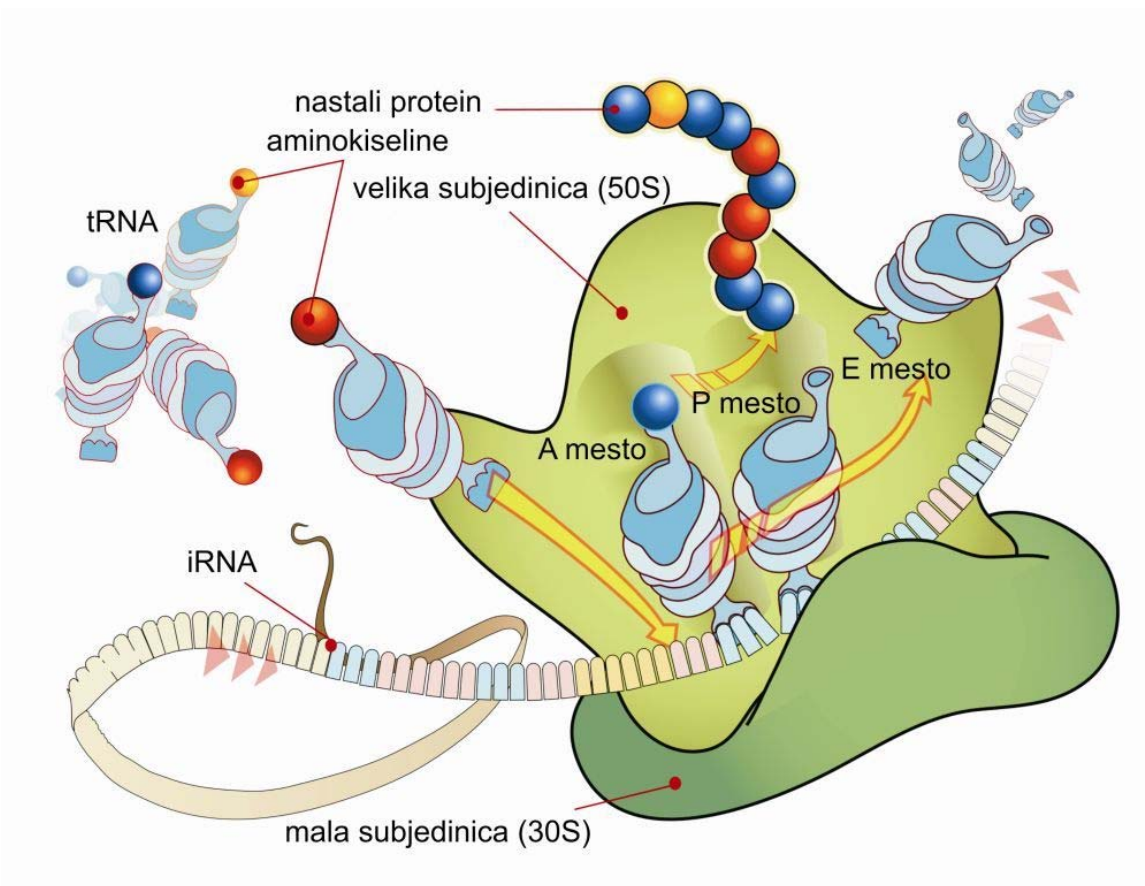
- Transkripcija - prenos genetičke informacije sa molekula DNA na informacionu RNA (iRNA)
- Translacija - iRNA nosi genetički kod u citoplazmu, gde služi kao matrica za sintezu proteina u ribozomima
- Post - translaciona modifikacija aminokiselinskih ostataka formiranog proteina
- Formiranje 3D strukture proteina

Usled dejstva RNA polimeraze i nukleotid transferaznih enzima (Slika 2), dolazi do transkripcije molekula DNA, pri čemu nastaje iRNA (Mariani & Maffioli, 2009). Sam proces transkripcije sastoji se iz više faza, koje uključuju vezivanje RNA polimeraze za DNA molekul, otvaranje DNA molekula i sintezu iRNA u smeru 5'-3'. Formirana iRNA odlazi u citoplazmu i vezuje se za ribozom (ribonukleoprotein), koji katalizuje sintezu proteina na osnovu iRNA. Sastavljen od RNA i proteina (Steitz, 2008), ribozom ima dve subjedinice (oznake 30S i 50S kod prokariotskih organizama) koje učestvuju u translaciji proteina.



Slika 2. Šematski prikaz procesa transkripcije.

Šematski prikaz sinteze proteina i odgovarajućih procesa dat je na Slici 3. U okviru veće subjedinice 50S i peptidil transferaznog centra (PTC) uočavamo aminoakceptorsko mesto (A), peptidilno mesto (P) i izlazno mesto tRNA (E).



Slika 3. Šematski prikaz procesa translacije.

Sinteza proteina započinje vezivanjem tRNA sa metioninom usled prepoznavanja AUG kodona na iRNA. Elongacija polipeptidnog lanca otpočinje ugradnjom druge aminokiseline u polipeptidnom lancu, i ponavlja se sve dok se ne pročita celokupna informacija sa iRNA

(sukcesivno se čitaju tripleti-kodoni u iRNA). Čitanje iRNA od strane ribozoma odvija se od 5' ka 3' kraju iRNA a sinteza polipeptida se vrši od NH₂-kraja ka COOH kraju polipeptidnog lanaca. Za proces elongacije potrebno je da oba mesta ribozoma, aminoakceptorsko mesto (A) i peptidilno mesto (P) budu zauzeti molekulima tRNA da bi došlo do formiranja peptidne veze. Na mestu P ribozoma mora da se nalazi peptidil-tRNA, dok se aminoacil-tRNA ubacuje na slobodno mesto A pomoću faktora elongacije (EF-Tu). Mehanizam formiranja peptidne veze podrazumeva prenos nascentnog peptida sa tRNA locirane na P mestu, na aminoacil-tRNA koja je locirana na A mestu ribozoma (proces transpeptidizacije). Na taj način polipeptidni lanac postaje duži za jednu aminokiselinu. Nakon transpeptidacije dolazi do translokacije, koji ima za cilj da se novonastala peptidil-tRNA prenese sa A na P mesto ribozoma, da se izbacila deacilirana-tRNA na E mestu i pomeri ribozom za jedan kodon prema 3' kraju iRNA. U toku rasta polipeptidnog lanca dolazi do njegovog usmeravanja ka izlazu iz 50S subjedinice, kroz kanal koji formiraju proteini te subjedinice. Proces translokacije se odigrava u prisustvu faktora elongacije EF-G. Terminacija sinteze polipeptidnog lanca je proces u kome se oslobađa kompletan sintetisani polipeptidni lanac. Signal za terminaciju je dolazak jednog od stop kodona (UAA, UAG, UGA) na A mesto ribozoma u procesu prenošenja informacije u iRNA na primarnu strukturu proteina. U interakciji faktora terminacije i ribozoma, dolazi do oslobađanja nascentnog polipeptidnog lanca ribozoma. Nakon toga dolazi do oslobađanja deacilirane tRNA i spadanje 70S ribozoma za iRNA. Oslobođeni ribozom disocira na subjedinice, koje se ponovo koriste za inicijaciju sinteze proteina.

2.2.2.4.1. Hloramfenikol

Hloramfenikol je antibiotik koji deluju bakteriostatički i baktericidno na veliki broj bakterija. U kliničkoj praksi se češće koristi u tretmanu Gram-pozitivnih bakterijskih sojeva. Eukariotske ćelije su rezistentne na hloramfenikol, mada dužim tretmanima hloramfenikol pokazuje značajne sporedne efekte kao što su disfunkcija jetre i eritropoetska depresija. On može da inhibira sintezu proteina u mitohondrijama eukariota ali i da utiče na sintezu DNA izazivajući supresiju koštane srži i fatalnu aplastičnu anemiju. I pored sadržaja dve hidroksilne grupe, njegova rastvorljivost u vodi je vrlo mala (2.5 g/l), što utiče na njegovu limitiranu kliničku primenu. Hloramfenikol inhibira sintezu proteina usled vezivanja za veću 50S subjedinicu ribozoma, u okviru aminoakceptorskog A mesta (Davidovitch et al., 2008). Na ovaj način sprečeno je pravilno pozicioniranje i unos sledeće aminoacil-tRNA i dalja sinteza proteina. Korišćenjem obeleženog ¹⁴C-hloramfenikola, kao i foto aktivnih derivata, ustanovljeno je da hloramfenikol formira reverzibilan kompleks sa mestom vezivanja na 70S

ribozomu, koga sačinjavaju proteini S3, S6, L6, L16 i L24. Međutim najobeleženiji protein je L16 i on je jedan od ključnih proteina za aktivnost peptidiltransferaznog centra 50S subjedinice. Rezistencija bakterija na hloramfenikol usled mutacija na ribozomalnoj 23S RNA (Mankin & Garret, 1991), takođe govore o značajnoj ulozi ovog mesta za antibakterijsku aktivnost hloramfenikola. Do danas su opisana dva glavna mehanizma rezistencije na hloramfenikol, aktivni efluks i enzimska inaktivacija. Pojedine studije su pokazale da je gradijent protona u membrani uzrok aktivnog efluksa i rezistencije na hloramfenikol (Moreira et al., 2005). Klinički najznačajniji mehanizam je O-acetilacija hloramfenikola posredovana enzimom *hloramfenikol-O-acetiltransferazom* (CAT). U literaturi se navode tri glavna tipa CAT, od kojih je najbolje opisan CAT3. Pokazano je da ovi enzimi inaktiviraju hloramfenikol acetilacijom primarne alkoholne grupe na C3 i C1 atomu stvarajući jedinjenja koja su neaktivna i ne mogu se vezati za 50S subjedinicu. Iako je hidrofoban molekul, hloramfenikol koristi pore spoljne membrane za penetraciju do periplazmatičnog prostora Gram-negativnih bakterija. Razlog za ovakvu pretpostavku leži u činjenici da odsustvo porina u bakterijama i njihova hemijska modifikacija rezultira u drastičnom smanjenju penetracije hloramfenikola (Anderson et al., 2012). Za razliku od tetraciklina i streptomycina, hloramfenikol je vrlo nepolaran molekul, čiji se transport iz periplazmatičnog prostora u citoplazmu do ribozoma, odvija njegovom solubilizacijom i difuzijom kroz citoplazmatičnu membranu (McMurry et al., 1994; Anderson et al., 2012).

2.2.2.4.2. Tetraciklin

Tetraciklini su antibiotici širokog spektra koji deluju bakteriostatički i baktericidno na veliki broj bakterija (Barbour et al., 2010). Inhibitorno delovanje ostvaruju zaustavljanjem sinteze proteina u senzitivnim bakterijama, inhibirajući vezivanje aminoacil-tRNA za ribozom. Izučavanjem mesta vezivanja tetraciklina za ribozom, došlo se do zaključka da se tetraciklini mogu vezati za 30S subjedinicu kao i za 70S ribozom. Detaljna izučavanja su pokazala da se tetraciklini specifično vezuju za jedno mesto na 70S ribozomu sa konstantom disocijacije 2×10^{-5} . Pored toga ustanovljeno je da radioaktivno obeleženi tetraciklin svoje vezivanje preferencijalno ostvaruje sa 30S subjedinicom ribozoma i to za protein S7 koji je u neposrednoj blizini aminoakceptorskog (A) mesta. Pored toga, smatra se da i visoko konzervisan region 16S rRNA može biti uključen u organizaciju mesta vezivanja tetraciklina, što se koristi i kao argument za objašnjavanje širokog antibakterijskog spektra tetraciklina. Stoga se smatra da je primarni inhibitorni efekat tetraciklina na sintezu proteina sprečavanje vezivanja aminoacil-tRNA za A mesto ribozoma, usled sprečavanja pravilnog prepoznavanja kodona na mRNA i antikodona na tRNA. Vezivanje antibiotika za ribozom dovodi do smanjenja fleksibilnosti

strukture ribozoma, odnosno do njegove steričke promene, koja onemogućava pravilnu interakciju i vezivanje aminoacil-tRNA za obe subjedinice ribozoma. Na osnovu jasno definisanih mesta antibiotske aktivnosti tetraciklina (16S rRNA i protein S7) i njihovih XRD struktura (Hosaka et al., 1997; Broderson et al., 2000) primenom molekularnog dokinga želeli smo posredno istaći aktivnost ulja u okviru ćelijskog zida i citoplazmatične membrane i eliminisati njihovu moguću interakciju sa ribozomima.

Pokazano je da bakterije koriste tri strategije za postizanje rezistencije na tetraciklin: a) ograničavanjem pristupa tetraciklina ribozomima preko kojih ostvaruje svoj inhibitorski efekat, b) promena strukture ribozoma da bi se sprečilo efikasno vezivanje tetraciklina i c) sinteza enzima koji inaktiviraju tetraciklin.

Da bi tetraciklin ostvario inhibitorski efekat potrebno je da se transportuje u ćeliju i da se akumulira do koncentracije koja omogućava njegovo vezivanje za ribozom, što izaziva prestanak sinteze proteina. Nađeno je da protonizovana forma tetraciklina može difundovati kroz citoplazmatičnu membranu. Međutim ova prosta difuzija ne može objasniti dostizanje dovoljne koncentracije da bi se spasio inhibitorski efekat na sintezu proteina. Eksperimenti su pokazali da pored difuzije dolazi i do faze transporta tetraciklina u procesu koji zahteva utrošak energije. Ovaj aktivan transport tetraciklina, ne zahteva protein nosač, već koristi protonski gradijent u citoplazmatičnoj membrani (ΔpH). Događaji koji se odvijaju pri prolasku tetraciklina kroz citoplazmatičnu membranu nisu sasvim jasni. Pokazano je da se ulazak tetraciklina u ćeliju sastoji iz dve faze – energetske nezavisne faze i energetske zavisne faze (Argast & Beck, 1984). Transport tetraciklina otpočinje veoma brzom energetske nezavisnom fazom. Ovaj proces posle izvesnog vremena dostiže ravnotežu i dalji sporiji ulazak tetraciklina u ćeliju je energetske zavisna faza. Supstance koje inhibiraju transport elektrona ili mutacije koje dovode do narušavanja transporta elektrona, inhibiraju energetske zavisnu fazu transporta elektrona. Stoga se može zaključiti da za ulazak u ćeliju u ovoj fazi, tetraciklin može koristiti energiju ili iz transporta elektrona ili iz ATP-a dobijenog u toku transporta elektrona pri oksidativnoj fosforilaciji. Ovo nam je dalo mogućnost, da primenom molekularnog dokinga na citohrom C oksidazu i ATP-azu (Harrenga & Michel, 1999; Rastogi & Girvin, 1999), ispitamo interakcije komponenata ulja i objasnimo slabije rezultate antibakterijske aktivnosti ulja sa tetraciklinom u odnosu na hloramfenikol. Postojanje veoma brzog i energetske nezavisnog ulaska tetraciklina u bakteriju, objašnjava zašto su i anerobne bakterije dostupne delovanju tetraciklina. Naime u anerobnim uslovima inhibiran je samo spor energetske zavistan ulazak tetraciklina, dok je brz energetske nezavistan ulazak tetraciklina u bakteriju neometen.

Mehanizam transporta tetraciklina i streptomocina, međusobno se razlikuju i to daje objašnjenje različitog delovanja ovih antibiotika na bakterije. Streptomicin veoma efikasno koristi transportne molekule i membranski potencijal, koji je rezultat funkcionisanja respiratornog lanca, za inicijalni ulazak u ćeliju. Tako su anaerobne bakterije visoko rezistentne na aminoglikozide (streptomicin), ali su senzitivne na tetracikline pošto se tetraciklin može transportovati energetski nezavisnim putem.

2.2.2.4.3. Streptomicin

Aminoglikozidi su antibiotici širokog spektra i deluju baktericidno na veliki broj bakterija. Inhibitorno delovanje ostvaruju zaustavljanjem sinteze proteina u različitim fazama, što zavisi od prirode molekula aminoglikozida. Prva istraživanja mehanizma delovanja streptomocina (aminoglikozida), pokazala su da ovaj antibiotik inhibira sintezu proteina usled vezivanja za 30S subjedinicu ribozoma. Njegova interakcija sa proteinom S12 i 16S rRNA, pored toga što inhibira ugradnju korektno aminokiseline za dati kodon u iRNA, indukuje i pogrešno čitanje kodona što omogućava inkorporaciju neke druge aminokiseline (Anderson et al., 2012). Zbog važnosti ova dva targeta za antibakterijsku aktivnost streptomocina, protein S12 i 16S rRNA (Carter et al., 2000; Connell et al., 2007) podvrgnuti su molekularnom dokingu u cilju sagledavanja mogućih interakcija komponenata ulja sa ovim važnim targetima. Testiranjem efekta streptomocina na pojedine reakcije u sintezi proteina ustanovljeno je da pored pogrešnog čitanja kodona na iRNA, streptomicin deluje i na proces inicijacije i terminacije sinteze proteina. Svi ovi podaci govore da streptomicin izaziva konformacionu promenu strukture ribozoma, što ima za posledicu njihovo neadekvatno delovanje u procesu sinteze proteina. Međutim za letalnost je takođe važan korak transfera streptomocina iz spoljne sredine do specifičnih mesta na ribozomu. Klinički potencijal aminoglikozida se značajno i ubrzano smanjuje usled širenja postojećih i sve većeg broja novih oblika rezistencije bakterija na ove antibiotike (Macmaster et al., 2010; Morić et al., 2010). Razlikujemo tri mehanizma rezistencije na antibiotike: a) smanjeni unos antibiotika u ćeliju b) ekspresija enzima kodiranih genima na plazmidima koji modifikuju hemijsku strukturu antibiotika acilacijom i fosforilacijom što dovodi do inaktivacije antibiotika i c) promene na nivou ribozoma, što dovodi do smanjenja afiniteta vezivanja aminoglikozida za njih.

Mehanizam transporta streptomocina kroz citoplazmatičnu membranu, značajan je faktor koji određuje dostupnost bakterija delovanju ovog agensa (Anderson et al., 2012). Aminoglikozidi, kao polikatjoni difunduju kroz pore spoljne membrane Gram-negativnih bakterija, dok je transport kroz citoplazmatičnu membranu sličan u Gram-negativnim i Gram-

pozitivnim bakterijama. Primarno mesto vezivanja streptomicina su polarne glave fosfolipida citoplazmatične membrane. Molekul transporter u membrani za koji se streptomicin vezuje, najverovatnije je komponenta citoplazmatične membrane koja je usko povezana sa uspostavljanjem gradijenta protona kroz membranu, odnosno predstavlja komponentu citoplazmatične membrane koja je direktno uključena (neki molekul respiratornog lanca) u formiranje tog gradijenta. Nakon vezivanja za transporter u membrani, streptomicin se prenosi kroz membranu u zavisnosti od vrednosti membranskog potencijala ($\Delta\psi$). Ta faza transporta naziva se EDP-1 (proces zavistan od energije). Kada se posle prolaska kroz membranu, streptomicin veže za target u citoplazmi-ribozom koji učestvuje u sintezi proteina i koji deluje kao odstranjivač streptomicina iz membrane, indukuje se ubrzani transport streptomicina u citoplazmu (faza transporta EDP-2). Najefikasniji izvor energije za transport aminoglikozida je transport elektrona do kiseonika. Transport elektrona na ATP u fosforilaciji na nivou supstrata je neefikasan izvor energije za transport aminoglikozida. Proces inicijalnog transporta aminoglikozida kroz citoplazmatičnu membranu (EDP-1), posledica je polikatjonske strukture ovih antibiotika. Aminoglikozidi se vežu za membranu i transportuju kroz nju zahvaljujući većoj količini negativnog naelektrisanja u citoplazmi ćelije od sredine koja je okružuje. Stoga je vezivanje i transport aminoglikozida kroz citoplazmatičnu membranu, antagonizovan prisustvom dvovalentnih katjona, kao i velikom količinom negativnih jona u spoljnoj sredini. Faza transporta EDP-1, završava se otpočinjanjem inhibicije sinteze proteina. Očigledno je da ova faza predstavlja inicijalni transfer aminoglikozida do ribozoma, koji je zavistan od energije. Druga faza EDP-2, povezana je sa vezivanjem aminoglikozida za ribosome što za posledicu ima značajno povećanu brzinu ulaska aminoglikozida u ćeliju. I ovaj proces ima isti energetski zahtev kao i EDP-1. Sam mehanizam EDP-2 nije sasvim jasan, ali se pretpostavlja da u vreme otpočinjanja ove faze dolazi do značajnog gubitka K^+ jona iz ćelije što uvećava ($\Delta\psi$). Druga pretpostavka govori o tome da vezivanje aminoglikozida za ribosome omogućava odvlačenje antibiotika iz membrane. Na taj način se izaziva povećanje transporta kroz citoplazmatičnu membranu pošto se smanjuje koncentracija aminoglikozida u njoj. Poređenjem streptomicina sa prethodno diskutovanim antibioticima, uočavamo da je njegov ulazak u citoplazmu ćelije energetski zavistan, za razliku od tetraciklina i hloramfenikola čiji je ulazak delimično ili totalno nezavistan od membranskog potencijala.

2.2.2.5. Mehanizam toksičnosti na citoplazmatičnoj membrani

Mnoge klase organskih jedinjenja ispoljavaju toksično dejstvo na ćelije usled njihovog akumuliranja u citoplazmatičnoj membrani. Pokazano je da je toksičnost ovih supstanci

korelirana sa particionim koeficijentom njihove raspodele u sistemu oktanol/voda ($\log P_{o/w}$). Supstance sa vrednostima $1 \leq \log P_{o/w} \leq 5$ uglavnom se smatraju da su toksične po ćeliju (Liu et al., 1982). Većina bakterija je tolerantna na rastvore nižih alkohola i kiselina. Sa druge strane, uočeno je da i izrazit lipofilni karakter supstance ne dovodi do toksičnih efekata. Većina organskih supstanci na osnovu svoje rastvorljivosti i lipofilne prirode se nalaze između rastvornih alkohola i lipofilnih jedinjenja. Pokazano je da su rastvarači umerene hidrofobnosti izuzetno toksični u odnosu na ćelije. Istraživanja su pokazala da aromatična jedinjenja, fenoli i terpenoidi imaju izražena antibakterijska svojstva, što je uticalo na njihovu primenu u proizvodnji konzervanasa, dezinfekcionih sredstava itd.. (Heipieper et al., 1991; Sikkema et al., 1992).

Antibakterijska aktivnost mnogih klasa organskih jedinjenja opisana je u brojnim studijama (Sikkema et al., 1994; Kabelitz et al., 2003). Sve studije su pokazale korelaciju između hidrofobnosti ($\log P_{o/w}$) i toksičnosti. Ovde treba naglasiti da je toksični efekat supstanci i njihova dozna zavisnost bila slična kod većine testiranih bakterija. Na osnovu ovoga, brojne studije su zaključile da je toksični efekat ugljovodonika posledica nespecifičnog poremećaja fluidnosti membrane usled njihovog akumuliranja u lipidnom dvosloju (Saito et al., 1994; Ferrante et al., 1995). Pokazano je da su supstance sa funkcionalnim grupama (alkoholi, aldehidi..) znatno toksičniji u odnosu na ugljovodonike, jer pored poremećaja fluidnosti membrane one pokazuju i specifičnu hemijsku toksičnost.

Na osnovu istraživanja Sikkema et al. (1994) utvrđen je odnos između $\log P_{o/w}$ vrednosti supstanci i particionog koeficijenta ćelijska membrana/pufer ($\log P_{m/b}$). Na osnovu particionih koeficijenata pokazano je da je sadržaj supstance u membrani čak osam puta manji u odnosu na njen sadržaj u oktanolu. U cilju boljeg razumevanja akumulacije supstance i njenog efekta na membranu izračunati su ($\log P_{m/b}$) koeficijenti:

$$\log P_{m/b} = 0.97 \times \log P_{o/w} - 0.64$$

Na osnovu izraza uočavamo da je $\log P_{o/w}$ važan parametar koji opisuje akumulaciju supstanci u membrani. Međutim pored hidrofobnosti supstance, sama struktura molekula utiče na njenu membransku rastvorljivost. Pokazano je da će se amfipatični molekuli rastvarati odlično u membranama usled amfipatične prirode fosfolipida u njoj.

Toksičan uticaj supstanci na strukturu i funkciju ćelijske membrane objašnjava se na više načina. Najčešće opisivan način jeste akumulacija supstanci u lipidnom dvosloju koja dovodi do nespecifične izmene ćelijske membrane i njenog bušenja. Pojedine studije su uočile rasipanje K^+ jona i ATP-a nakon tretiranja bakterije fenolom (Heipieper et al., 1991). Uočeno je curenje fosfolipida, proteina pa čak i RNA molekula usled dejstva toluena na pojedine

bakterije. Smatra se da je curenje ćelijske membrane posledica njenog značajnog oštećenja, pri čemu je struktura ćelijskog zida nepromenjena. Ispitivanja sa tetralinom su pokazala povećanu izmenu protona u veštačkim membranama (Heipieper et al., 1994). Pokazano je da supstance mogu izazvati pasivan fluks protona i jona koji mogu razoriti protonski gradijent (ΔpH) i membranski potencijal ($\Delta \psi$).

Važan mehanizam antibakterijske aktivnosti supstanci jeste razaranje energetskog statusa ćelije. Uticaj supstanci na prenošenje i pretvaranje energije u okviru ćelije, ispitano je na enzim citoplazmatične membrane citohrom C oksidazu. Pokazano je da je ovaj enzim odgovoran za formiranje protonskog gradijenta (ΔpH) i membranskog potencijal ($\Delta \psi$). Eksperimenti tetralina sa citohrom C oksidazom su pokazali smanjenje protonskog gradijenta (ΔpH) za 80% i membranskog potencijal ($\Delta \psi$) za 50% (Sikkema et al., 1994). U istoj studiji je pokazano da različite supstance, slične membranske koncentracije ($\log P_{m/b}$) ispoljavaju sličan efekat. Smanjenje protonskog gradijenta (ΔpH) nije jedini uzrok smanjenja energetskog statusa i membranskog potencijala ćelije. Pokazano je da supstance inhibiraju nastanak ATP-a usled parcijalne inhibicije enzima ATP-aze i proteina uključenih u procesu prenosa energije (Uribe et al., 1990). Eksperimentalni rezultati ove doktorske teze, indikativno i nedvosmisleno ukazuju da je aktivnost etarskih ulja i njihovih komponenata usmerena na razaranje protonskog gradijenta i membranskog potencijala citoplazmatične membrane. Primenom molekularnog dokinga na definisane targete antibiotika, ćelijskog zida i citoplazmatične membrane pokušaćemo uočiti i potvrditi indikacije eksperimentalnih rezultata.

Veoma je bitno naglasiti da je veza između toksičnosti supstance i njene hidrofobnosti jedino validna za određenu $\log P_{o/w}$ vrednost. Pri većoj hidrofobnosti (više vrednosti $\log P_{o/w}$), drugi važan parametar koji doprinosi toksičnosti supstance jeste njena rastvorljivost. Pokazano je da supstance koje su jako hidrofobne (alkani, bifenili) nemaju toksičnu aktivnost upravo zbog njihove male rastvorljivosti. Mala rastvorljivost ovih supstanci onemogućava njihovu biodostupnost i postizanje koncentracija koje bi bile letalne za ćeliju. Upravo zbog ovoga uveden je koeficijent $\log P_{m/b}$ koji u kombinaciji sa rastvorljivošću supstance, određuje maksimalnu koncentraciju supstance (MMC) u ćelijskoj membrani (de Bont, 1998). Na osnovu iznetog uočavamo da maksimalna koncentracija supstance u ćelijskoj membrani zavisi od koncentracije supstance u vodenoj fazi, njenog prelaska iz vode u membranu i odnosa njihovih zapremina. Korišćenjem i transformacijom $\log P_{o/w}$ vrednosti u $\log P_{m/b}$ moguće je odrediti maksimalnu koncentraciju supstanci u ćelijskoj membrani (Neumann et al., 2005).

2.3. Hemometrijske metode analize

Kao što je istaknuto u uvodnom delu, hemometrija je hemijska disciplina koja koristi matematičke i statističke metode, da oblikuje ili odabere optimalan postupak merenja ili eksperiment i omogući dobijanje maksimalnog broja informacija o analiziranom sistemu (Mathias, 2007). Najčešća primena hemometrije je u analizi skupa podataka i prepoznavanju matematičkih modela. Područija primene mogu se podeliti u četiri grupe. Jedna od grupa metoda je postupak koji omogućava prikupljanje valjanih podataka. Drugu grupu čine metode odabira korisnih informacija iz valjanih podataka. Treću grupu metoda čine metode analize spektroskopskih podataka i četvrtu grupu čine metode veštačke inteligencije (Wold & Sjöström, 1998).

2.3.1. Selektivna jon analiza (SIA)

U uslovima preklapanja pikova komponenata etarskog ulja na GC-MS hromatogramu, neophodno je primeniti hemometrijsku metodu selektivne jon analize (SIA). Selektivna jon analiza je rezoluciona hemometrijska metoda, zasnovana na teoriji različitih odgovora ispitivanih komponenata na određenim m/z vrednostima. Ispitane m/z vrednosti se nazivaju selektivne tačke. Osnovna ideja SIA metode je efikasno iskorišćavanje selektivnosti masenog spektra. Hemometrijska SIA metoda se sastoji iz sledećih koraka: 1) pronalazak selektivnih jona preklopljenih komponenata, 2) ekstrakcija hromatografskog profila preklopljenih komponenata na osnovu odgovarajućih selektivnih jona, 3) dobijanje čistih masenih spektara preklopljenih komponenata metodom najmanjih kvadrata, 4) validacija pouzdanosti dobivenih rezultata. Primena i princip SIA metode detaljno je objašnjena u studijama (Tan et al., 2010; Miladinović et al., 2012).

2.3.2. Metoda glavnih komponenata (PCA) i klaster analize (HCA)

Analiza glavnih komponenata je metoda hemometrijske analize koja se koristi u cilju smanjenja dimenzije sistema (skupa) podataka uz što veće zadržavanje njegove varijabilnosti, kako bi se olakšalo predstavljanje podataka, bolje sagledala struktura sistema i odnosi među korišćenim promenljivim. Metoda glavnih komponenata koncentriše varijabilnost na prve glavne komponente.

Prva glavna komponenta (PC1) objašnjava što je moguće veći deo varijabilnosti svih posmatranih osobina. Druga glavna komponenta (PC2), nezavisno od prve, objašnjava najveću varijabilnost od onog što preostaje kad se izdvoji prva komponenta. Izbacivanje iz sistema svih komponenata (svojstvenih vektora) koje imaju karakteristične svojstvene vrednosti manje od jedinice je jedan od načina izbora broja odgovarajućih posmatranih glavnih komponenata. Ponekad je potrebno izabrati za posmatranje onoliko glavnih

komponenti koliko je potrebno da bi se objasnio zadovoljavajući procenat varijabilnosti sistema. PCA analiza je linearnom kombinacijom promenljivih i formiranjem svojstvenih vektora omogućila zadržavanje maksimalne varijanse među uzorcima i smanjenje dimenzija ispitanih sistema. Primenom PCA metode omogućeno je uočavanje odgovornih promenljivih (varijabli) za HCA klasifikaciju uzoraka.

Klaster analiza (HCA) je hemometrijska metoda čija je primarna svrha grupisanje objekata, bazirana na karakteristikama koje poseduju. Klaster analiza klasifikuje objekte tako da je svaki objekat veoma sličan drugima u klasteru uz poštovanje nekog unapred određenog kriterijuma selekcije. Nastali skupovi objekata bi trebalo da pokažu visoku sličnost unutar klastera i visoku eksternu različitost između klastera.

Primarni cilj klaster analize je podela objekata u dve ili više grupa, na osnovu sličnosti promenljivih. Postoji veći broj različitih mera udaljenosti koje karakterišu sličnost/različitost između objekata u klasteru. Najčešće primenjivana je euklidska udaljenost koja se računa kao kvadratni koren iz sume kvadratnih razlika vrednosti za sve varijable. Jedan od načina povezivanja objekta u okviru klastera jeste postupak potpunog povezivanja koji je zasnovan na maksimalnoj udaljenosti objekata. Metodom potpunog povezivanja i primenom euklidske udaljenosti HCA analizom su konstruisani odgovarajući dendrogrami (Brereton, 2003).

2.3.3. Metoda molekularnog dokinga (SAR)

U oblasti molekularnog modelovanja, SAR (Structure Activity Relationships) je metoda koja predviđa željenu orijentaciju jednog molekula u odnosu na drugi, u fazi povezivanja i formiraja stabilnog kompleksa. Poznavanje poželjne orijentacije može da se koristi za predviđanje snage udruživanja ili afiniteta vezivanja dva molekula (Lengauer & Rarey, 1996). U cilju određivanja afiniteta i energije vezivanja supstanci za važna mesta antibakterijske aktivnosti, primenjena je metoda molekularnog dokinga. Ova metoda je zasnovana na jasno definisanim NMR i XRD strukturama receptora (Hus et al., 2000), koji su u delu mehanizma dejstva antibiotika i etarskih ulja objašnjeni ili predloženi kao moguća ciljna mesta antibakterijske aktivnosti. Svi ispitani receptori su dostupni u bazi Protein Data Bank-PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) koja sadrži više od 70000 proteina sa jasno definisanim 3D strukturama. Većina dostupnih receptora ove baze je u obliku kompleksa sa supstratom ili inhibitorom, pružajući nam dodatne informacije o osobini vezujućeg mesta. U odnosu na ostale "*in silico*" pristupe (na primer QSAR), metoda molekularnog dokinga, na relativno brz i jednostavan način, pruža veliki broj informacija o afinitetu i energetski povoljnim konformacijama vezivanja supstanci za receptorska mesta. Slično ostalim "*in silico*" metodama i ova metoda se sreće sa problemima u vidu korišćenja rigidnih PDB

receptora, zanemarenog uticaja solvatacije, protonizacije i tautomerizacije. Međutim i pored nekih nedostataka, ovo je danas najkorišćenija "*in silico*" metoda.

Prvi korak računarske simulacije SAR metode je stavljanje potencijalnog liganda na vezujuće mesto ispitivanog targeta. Ovaj korak je poznat kao doking. Cilj ovog koraka je određivanje konformacija koje sterno najbolje odgovaraju vezujućem mestu i koje su energetske najpovoljnije. Reddy et al. (2007) je podelio brojne doking programe na osnovu algoritma kojim se vrši proračun energetske konformacije.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Biljni materijal, supstance i korišćene hemikalije

Nadzemni delovi biljnih vrsta sakupljeni su na području istočne Srbije. Taksonomsku pripadnost populacija je determinisala dr Marija S. Marković sa Odseka za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Herbarijumski uzorci biljaka su deponovani u herbarijumu Odseka za botaniku, Biološkog fakulteta u Beogradu. U Tabeli 1, prikazan je detaljan opis biljnih vrsta, koje su bile predmet rada u ovoj studiji.

Tabela 1. Pregled odabranih biljnih vrsta.

Takson	Lokalitet	Datum sakupljanja	Vaučeri br. (BEOU)
<i>Thymus glabrescens</i> Willd.	Kravlje	08. 06. 2011. god.	16642
<i>Thymus pulegioides</i> L.	Suva Planina	07. 08. 2011. god.	16525
<i>Satureja kitaibelii</i> Wierzb. ex Heuff.	Sićevačka klisura	12. 05. 2011. god.	16557
<i>Nepeta nuda</i> L.	Suva Planina	07. 08. 2011. god.	16524
<i>Libanotis montana</i>	Vidlič	23. 07. 2011. god.	16548
<i>Peucedanum longifolium</i> Waldst. & Kit.	Rtanj	31. 07. 2011. god.	16537
<i>Peucedanum officinale</i> L.	Stara Planina	04. 09. 2011. god.	16538
<i>Inula graveolens</i> L.	Stara Planina	04. 09. 2011. god.	16532

Sve korišćene supstance i reagensi su bili visoke analitičke čistoće. Hemikalije korišćene za određivanje metala nabavljene su od proizvođača Carlo Erba. Referentni standard BCR-701 je isporučen od strane "Community Bureau of Reference Sample" (BCR). Standardni rastvori korišći u ICP-OES tehnici su dobijeni od Alfa Aesar, Nemačka.

Odabrani antibiotici (tetraciklin, streptomycin, hloramfenikol) i čiste supstance (geraniol, timol, linalool, eukaliptol, geranil acetat, limonen) kupljeni su od Sigma-Aldrich i Carl-Roth dobavljača.

3.2. Određivanje sadržaja metala

3.2.1. Mikrotalasna digestija zemljišta i biljnog materijala

Mikrotalasna digestija je izvedena u mikrotalasnoj peći ETHOS 1 (Milestone, Italija) u zatvorenim poli tetra fluoro etilenskim (PTFE) sudovima, pri čemu je korišćena smeša 4 ml HNO₃, 4 ml H₂SO₄ i 2 ml HF, za 0.5 g uzorka zemljišta. Temperatura peći je prvih 20 minuta dostigla 220 °C, a zatim je održavana konstantnom sledećih 15 minuta (maksimalna snaga iznosila je 1250 W). Biljni uzorci mase 1 g su razoreni korišćenjem 7 ml HNO₃ i 2 ml H₂O₂. U slučaju ispitivanja biljnih uzoraka, temperatura peći je prvih 15 minuta dostigla 200 °C, a zatim je održavana konstantnom sledećih 15 minuta. Ohlađeni rastvori su razblaženi dejonizovanom vodom u normalnim sudovima od 50 ml.

3.2.2. Analiza metala

Sadržaj metala: Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn u uzorcima je određen optičko emisionom spektroskopijom sa induktivno spregnutom plazmom - ICP-OES tehnika (Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP spektrometar, Velika Britanija). Standardni rastvori su pripremani korišćenjem 1000 mg/l rastvora ispitanih metala Instrumentalna kalibracija je proveravana na svakih 3-4 uzorka. Za određivanje metala u BCR ekstraktima, korišćeni standardi i slepe probe pripremani su na identičan način kao i ispitivani uzorci, u cilju eliminacije uticaja rastvarača i korekcije pozadine.

3.2.3. Sekvencionalna BCR ekstrakcija

Postupak ekstrakcije je izveden u poli tetra fluoro etilenskim čašama (50 ml) ispunjenim sa 1 g uzoraka zemlje i neophodnim reagenasima za ekstrakciju.

Rastvor A (CH_3COOH , 0.11 mol/l): 25 ml glacijalne CH_3COOH (Fluka, puriss. p.a., ACS reagent, $\geq 99.8\%$) je dodato u 0.5 l H_2O a zatim je razblaživanjem napravljen rastvor zapremine 1 l. Zapremina od 250 ml ovog rastvora (CH_3COOH , 0.44 mol/l) je razblažena do 1 l da bi se dobio rastvor neophodne koncentracije (CH_3COOH , 0.11 mol/l).

Rastvor B ($\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$, 0.5 mol/l): 34.7 g $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ (Fluka, puriss. p.a., for AAS, $\geq 99.0\%$) je rastvoreno u 400 ml H_2O . Rastvor je zakišljen sa 25 ml 2 mol/l HNO_3 (pripremljene adekvatnim razblaživanjem $\text{HNO}_3(\text{cc})$) i razblažen do zapremine od 1 l. Ovaj rastvor je pripreman na isti dan sekvencionalne ekstrakcije.

Rastvor C (H_2O_2 , 8.8 mol/l): korišćen je čist H_2O_2 proizvođača (Fluka, Trace Select 30%).

Rastvor D ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 1.0 mol/l): 77.08 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Carlo Erba, ACS reagent, $\geq 97\%$) je rastvoreno u 800 ml H_2O . Rastvor je zakišljen sa $\text{HNO}_3(\text{cc})$ do pH 2 i razblažen do zapremine od 1 l.

Kao što je pokazano u studijama (Zimmerman & Weindorf, 2010; Sutherland, 2010; Reid et al., 2011), sekvencionalnom BCR ekstrakcijom se kvantitativno određuju: a) metali u izmenljivoj/karbonatnoj frakciji (I faza), b) metali u obilku Fe/Mn oksida-redukujuća frakcija (II faza) i c) metali u obliku organske materije i sulfida-oksidujuća frakcija (III faza). Proces sekvencionalne ekstrakcije detaljno je opisan u narednom delu teksta.

I faza: 1 g uzorka je prenet u čašu (50 ml). Dodato je 40 ml rastvora A i mešano 16 h na sobnoj temperaturi. Ekstrakt je odvojen od čvrstog ostatka centrifugiranjem i dekantovanjem supernatanta tečnosti. Ekstrahovana frakcija je čuvana na 4 °C do ICP-OES analize. Čvrst ostatak je ispiran dodavanjem 20 ml H_2O . Rastvor je mešan 15 minuta a zatim je dodata H_2O uklonjena centrifugiranjem i dekantovanjem, vodeći računa da se ne odbaci ispitivan čvrst ostatak.

II faza: 40 ml rastvora B je dodato na čvrst ostatak iz I faze. Ekstrakcija je izvedena kao što je opisano u fazi I. Ostatak je ispran dodavanjem 2 ml H₂O, uz mešanje 15 min, a zatim je dodata H₂O uklonjena centrifugiranjem i dekantovanjem.

III faza: pažljivo u malim porcijama, u cilju izbegavanja burne reakcije, 10 ml rastvora C je dodato na čvrst ostatak iz faze II. Suspenzija ispitnog uzorka je povremeno mešana na sobnoj temperaturi, u toku 1 h, u cilju što potpunijeg rastvaranja uzorka. Digestija je nastavljena 1 h na 85±2 °C na vodenom kupatilu, a zatim je rastvor uparen na 3 ml. Još 10 ml rastvora C je dodato a digestija je ponovo nastavljena na 85±2 °C u trajanju od 1 h. Nakon uparavanja rastvora na zapreminu od 1 ml, ekstrakcija je nastavljena dodavanjem 50 ml rastvora D. Postupak ekstrakcije rastvorom D objašnjen je u I fazi sekvencionalne ekstrakcije.

3.2.4. Ispitivanje uzoraka zemljišta metodom rendgenske difrakcije (XRD-analiza)

Uzorci su ispitani na difraktometru za prah PHILIPS PW 1710 pod sledećim uslovima: upotrebljeno je zračenje sa antikatode bakra talasne dužine $\text{CuK}\alpha = 1,54178 \text{ \AA}$ i grafitni monohromator. Radni napon na cevi bio je $U = 40 \text{ kV}$, jačina struje $I = 30 \text{ mA}$. Uzorak je ispitivan u opsegu $3 - 70^\circ 2\theta$ sa korakom 0.02° i vremenskim zadržavanjem 2.0 sekunde na svakom koraku. Dobijeni podaci položaja difrakcionih maksimuma 2θ ($^\circ$), kao i odgovarajući intenziteti I dati su grafički. Na osnovu dobijenih vrednosti intenziteta I/I_{max} i međupljosnih rastojanja d i upoređivanjem sa literaturnim podacima i JCPDS standardima identifikovane su prisutne kristalne faze. Učešće kristalnih faza određeno je semikvantitativno.

3.2.5. Određivanje kiselosti, redoks potencijala, provodljivosti, sadržaja organske materije i katjonsko izmenjivačkog kapaciteta zemljišta

Potenciometrijska analiza i primena pH-metra (Hach-sensION 3), omogućila je određivanje pH vrednosti zemljišta. Kalibracija pH metra vršena je sistemom pufera: $\text{pH} = 4 \pm 0.02$ (Titrisol, Merck, citrat pufer), $\text{pH} = 7 \pm 0.02$ (Titrisol, Merck, fosfatni pufer) i $\text{pH} = 10 \pm 0.02$ (TitriVal, Kemika, borna kiselina-kalijum hlorid-natrijum hidroksid). Nakon 2 h mešanja na magnetnoj mešalici, izmerena je pH vrednost suspenzije uzorka (25 ml destilovane vode/5 g zemljišta).

Potenciometrijska analiza i primena pH-metra (Hach-sensION 3), omogućila je određivanje vrednosti redoks potencijala (Eh) zemljišta. Nakon 2 h mešanja na magnetnoj mešalici, izmerena je Eh vrednost suspenzije uzorka (25 ml destilovane vode/5 g zemljišta).

Konduktometrijska analiza i primena konduktometra (Hach-sensION 5) omogućila je određivanje vrednosti električne provodljivosti (EC) zemljišta. Kalibracija konduktometra vršena je standardnim rastvorom Hasch-NaCl (1000 $\mu\text{S/cm}$). Nakon 2 h mešanja na

magnetnoj mešalici, izmerena je EC vrednost suspenzije uzoraka (25 ml destilovane vode/5 g zemljišta).

Gravimetrijskom analizom i žarenjem zemljišta na 815 °C, indirektno je određena količina organske materije u uzorcima na osnovu sadržaja mineralnih materija i količine pepela.

Katjonsko izmenjivački kapacitet zemljišta (CEC), određen je nakon 16 h mešanja suspenzije uzoraka (25 ml $\text{CH}_3\text{COONH}_4/5$ g zemljišta). Ekstrakt je odvojen od čvrstog ostatka filtriranjem, a čvrst ostatak je ispiran 95% etanolom. U cilju određivanja CEC kapaciteta zemljišta, vršena je ekstrakcija NH_4^+ jona rastvorom KCl (0.1 mol/l), pri čemu je koncentracija NH_4^+ jona određena kolorimetrijski.

3.3. Hemijski sastav etarskih ulja

3.3.1. Izolovanje etarskog ulja

Osušeni i usitnjeni biljni delovi podvrgnuti su procesu hidrodestilacije na Clavenger aparatu u trajanju od 4 sata. Izolovano etarsko ulje je osušeno anhidrovanim natrijum-sulfatom i čuvano na temperaturi od 4 °C.

3.3.2. Gasna hromatografija (GC)

GC analiza etarskog ulja je urađena na gasnom hromatografu HP-5890 Series II, opremljenim split-splitless injektorom, kapilarnom kolonom sa HP-5MS stacionarnom fazom (30 m × 0.25 mm; debljina filma 0.25 μm), helijumom kao nosećim gasom (1 ml/min) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Temperatura injektora iznosila je 250 °C, detektora 280 °C, dok je temperatura kolone linearno povećavana od 50–250 °C (3 °C/min).

3.3.3. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC-MS)

GC-MS analiza je urađena na Agilent Technologies aparatu, model GS 6890N pri 70 eV, sa detektorom tipa MSD 5975C, pod istim gasno-hromatografskim uslovima.

3.3.4. Identifikacija komponenata etarskog ulja

Identifikacija komponenata ulja vršena je masenospektrometrijski, poređenjem aritmetičkih retencionih indekasa, retencionih vremena i masenih spektara komponenti sa referentnim supstancama i/ili jedinjenjima iz raspoložive baze podataka (Wiley 275, NIST/NBS). Primenom programa AMDIS (ver. 2.64), u kombinaciji sa SIA hemometrijskom metodom dobijene su eksperimentalne vrednosti aritmetičkih indekasa (AIE), koje su bile u saglasnosti sa literaturnim vrednostima aritmetičkih (AIL) indeksa (Adams, 2007). Aritmetički retencioni indeksi su proračunati na osnovu koiniciranja sa standardnom smešom $\text{C}_7\text{-C}_{40}$ ugljovodonika.

3.4. Antibakterijska aktivnost ispitanih supstanci

3.4.1. Ispitane supstance

Sva etarska ulja ispitanih biljnih vrsta, čiste supstance (geraniol, timol, linalool, eukaliptol, geranil acetat, limonen) i odabrani antibiotici (tetraciklin, streptomycin, hloramfenikol) podvrgnuti su ispitivanju antibakterijske aktivnosti.

3.4.2. Bakterijski sojevi

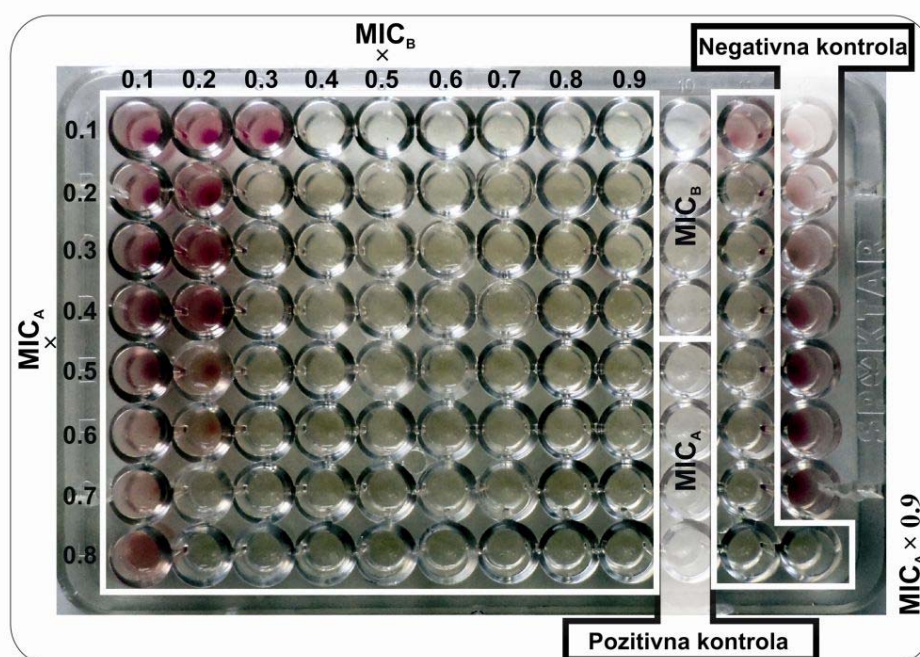
Antibakterijska aktivnost etarskih ulja, dominantnih komponenata ulja i antibiotika ispitana je na trinaest referentnih ATCC sojeva. Ispitani Gram-negativni sojevi su: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ispitani Gram-pozitivni sojevi su: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 i *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Od prekonoćnih kultura bakterijskih sojeva su pripravljene suspenzije turbiditeta 0.5 McFarlanda (gustine 10^8 CFU/ml), propisano od strane "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI, 2009). Turbiditet suspenzija određivan je korišćenjem DINKO McFarland kolorimetra.

3.4.3. Mikrodiluciona metoda

Primenom mikrodilucione metode je određena minimalna inhibitorska koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija supstanci (MBC) (CLSI, 2009). U etanolu (70%) su pripravljene serije duplih razblaženja supstanci i zatim je 10 μ l u 90 μ l inokulisane tečne podloge (Mueller-Hinton bujon) unošeno u mikrotitar ploče sa 96 udubljenja. Ukupna zapremina u svakom udubljenju je bila 100 μ l, konačna gustina bakterijskih ćelija 10^7 CFU/ml, a koncentracije proučavanih supstanci izražene su jedinicama μ g/ml. Mikrotitar ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Svi eksperimenti su urađeni u tri ponavljanja. Korišćene su dve kontrole, hranljivi medijum sa rastvaračem etanolom (negativna kontrola) i ispitani antibiotici (pozitivna kontrola). Bakterijski rast je detektovan dodavanjem po 20 μ l 0.5% vodenog rastvora trifetil-tetrazolium-hlorida (TTC). MIC je definisana kao najniža koncentracija supstanci pri kojoj nema vidljivog rasta bakterija, crveno obojenih kolonija na dnu udubljenja mikrotitar ploče nakon dodavanja TTC-a. Da bi se odredila MBC, sadržaj udubljenja u kojima nije bilo vidljivog rasta je prenet na petri ploče sa Mueller-Hinton agarom (MHA) i inkubiran 24 h na 37 °C, nakon čega su brojane porasle kolonije. MBC je ona koncentracija ulja pri kojoj je ubijeno 99.9% od početnog broja bakterijskih ćelija.

3.4.4. Mikrodilucionna "checkerboard" metoda

Mikrodilucionna "checkerboard" metoda je tehnika koja se koristi u *in vitro* uslovima u cilju određivanja antibakterijske aktivnosti smeša (Dougherty et al., 1977; Van Vuuren et al., 2009). Na osnovu predhodno određenih MIC vrednosti, napravljene su serije standardnih rastvora supstanci [(0.1-0.9)×MIC], u cilju ispitivanja njihove kombinovane interakcije. Antibakterijska aktivnost proučavanih smeša (kombinacija supstanci), ispitana je na pet referentnih ATCC sojeva. Ispitani "checkerboard" sojevi su: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *S. aureus* ATCC 29213. Ovi sojevi su odabrani kao najčešći uzročnici infektivnih bolesti.



Slika 4. Šematski prikaz kombinovanja supstanci A i B u mikrotitar ploči.

Sledeći smernice i preporuke standardnih procedura (CLSI, 2009), ispitane su kombinacije čistih supstanci i antibiotika, kao i međusobne kombinacije pojedinih supstanci. Raspored i način unošenja ispitanih rastvora, šematski je predstavljen na Slici 4. Inokulisane mikrotitar ploče su inkubirane 24 h na 37 °C, nakon čega je detektovan bakterijski rast. Tip interakcija između ispitanih supstanci jasno je definisan i objašnjen jednačinom koju su ustanovili Chou & Talalay (1984). Interakcije između supstanci se mogu definisati kao sinergističke, aditivne i antagonističke. U cilju kvantitativnog određivanja interakcija, uveden je pojam fracione inhibitorne koncentracije (FIC). Na osnovu ispitivanja (Chou & Talalay, 1984), pokazano je da se FIC indeks smeša (supstance različitog mehanizma dejstva) računa na sledeći način:

$$FIC = \frac{MIC_A \text{ smeše}}{MIC_A} + \frac{MIC_B \text{ smeše}}{MIC_B} + \frac{MIC_A \text{ smeše} \times MIC_B \text{ smeše}}{MIC_A \times MIC_B}$$

$$FIC = FIC_A + FIC_B + FIC_A \times FIC_B$$

gde su:

MIC_A i MIC_B - minimalne inhibitorske koncentracije supstanci

MIC_A smeše i MIC_B smeše - minimalne inhibitorske koncentracije supstanci u smeši

FIC_A i FIC_B - frakcioni indeksi pojedinačnih supstanci

Primenom programa CalcuSyn (Biosoft) izračunate su FIC vrednosti ispitanih kombinacija, a rezultati su interpretirani kao: sinergizam ($FIC < 0.90$), aditivno dejstvo ($0.90 \leq FIC \leq 1.10$) ili antagonizam ($FIC > 1.10$) (Wyles et al., 2007).

3.5. Hemometrijska obrada podataka

U cilju pouzdane identifikacije komponenata i analize preklapljenih pikova na GC-MS hromatogramu, primenjena je hemometrijska metoda selektivne jon analize (SIA). Kombinovanom primenom programa Master Data Analysis, AMDIS i programa Mathworks MATLAB izvršena je detaljna analiza m/z vrednosti hromatograma.

U cilju uočavanja odnosa i korelacija, eksperimentalni rezultati ove studije su hemometrijski ispitani kombinovanom primenom metoda glavnih komponenata (PCA) i klaster analize (HCA). Korišćenje programa Mathworks MATLAB i programa STATISTICA 8, omogućilo je detaljnu hemometrijsku analizu.

Za određivanje afiniteta i energije vezivanja supstanci za važna mesta antibakterijske aktivnosti, primenjena je metoda molekularnog dokinga (SAR metoda). Na osnovu jasno definisanih NMR i XRD struktura receptora, dostupnih u bazi Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), primenom programa AutoDock Vina i Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno iterativnog algoritma, definisane su energetske najpovoljnije konformacije ispitanih liganada.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1.Sadržaj metala u zemljištu

Kao što je poznato, genetska predispozicija biljne vrste i hemijski sastav zemljišta su odlučujući faktori koji determinišu akumulaciju hemijskih elemenata u biljci. U cilju boljeg sagledavanja i razumevanja akumulacije metala u biljnim vrstama izvršena je detaljna hemijska analiza zemljišta. Ukupan sadržaj metala u zemljištu ne daje podatke o njihovoj biološkoj dostupnosti, toksičnosti i distribuciji, međutim znanje o njihovoj interakciji sa ostalim materijama u zemljištu bi nam pomoglo u razumevanju njihove akumulacije u biljkama. Na osnovu navedenog, izvršena je sekvencionalna BCR analiza zemljišta, čiji je postupak opisan. Kao što je pokazano u studijama (Zimmerman & Weindorf, 2010; Sutherland 2010; Reid et al., 2011), BCR analizom se kvantitativno određuju: a) metali u izmenljivoj/karbonatnoj frakciji (I faza), b) metali u obliku Fe/Mn oksida-redukujuća frakcija (II faza) i c) metali u obliku organske materije i sulfida-oksidujuća frakcija (III faza). Rezultati sekvencionalne ekstrakcije i ukupna koncentracija makro i mikroelemenata ispitanih uzoraka, prikazani su u Tabelama 2 i 3. Pouzdanost i preciznost analize elemenata, proveravan je korišćenjem BCR-701 standarda a relativne standardna devijacija analize metala data je u Tabelama 2 i 3. Ukupna koncentracija ispitanih elemenata kretala se u intervalu: natrijum (289.06-2410.86 ppm), kalijum (4030.65-10871.18 ppm), magnezijum (1159.37-3229.80 ppm), kalcijum (10251.92-154250.35 ppm), mangan (11.03-1280.25 ppm), gvožđe (4786.97-15411.14 ppm), bakar (2.25-17.05 ppm) i cink (8.45-54.53 ppm). Koncentracije ispitanih metala nalaze se u granicama propisanih vrednosti za zemljište (Sparks, 2003). U cilju poređenja zemljišta na osnovu ukupnog sadržaja metala i sastava pojedinih frakcija izvršena je hemometrijska analiza.

4.1.1. Hemometrijska analiza sadržaja metala karbonatne frakcije zemljišta

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sadržaj metala u karbonatnoj frakciji u cilju procene sličnosti zemljišta na osnovu dostupnosti ispitivanih metala u biljci. Koncentracija ispitanih elemenata (Tabele 2 i 3), kretala se u intervalu: a) natrijum (5.59-25.28 ppm), b) kalijum (73.73-313.81 ppm), c) magnezijum (103.89-606.23 ppm), d) kalcijum (829.93-78283.89 ppm), e) mangan (4.60-305.35 ppm), f) gvožđe (2.08-26.63 ppm), g) bakar (0.01-0.06 ppm) i h) cink (0.01-2.19 ppm). Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 53.82% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 32.53% (Slika 5A). Slika 5B, ilustruje uticaj ispitanih metala karbonatne faze, na klasifikaciju ispitanih zemljišta (Slika 5C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 77456 (Slika 5D), HCA analiza je podelila zemljišta

Tabela 2. Koncentracija alkalnih i zemnoalkalnih metala u zemljištu.

Element (ppm)	Frakcija (faza)	Kravlje	Suva Planina	Sićevačka klisura	Vidlič	Rtanj	Stara Planina	BCR-701 standard	RSD* (%)	ZK** (ppm)
Na	I	18.71	10.64	25.28	12.19	12.69	5.59	57.01	1.94	23000
	II	12.92	2.67	10.26	2.85	3.18	0.50	20.70		
	III	6.75	6.80	5.47	6.86	7.40	3.70	18.07		
	Ukupno	2162.47	2410.86	718.69	815.47	1266.73	289.06	97.64		
K	I	313.81	73.73	282.40	232.78	188.04	108.88	115.44	0.82	21000
	II	286.03	95.41	155.93	179.57	204.63	74.51	150.34		
	III	104.99	48.51	41.96	86.73	127.01	27.31	53.69		
	Ukupno	6880.97	7315.09	4030.65	6740.61	4997.30	10871.18	322.09		
Mg	I	446.67	223.25	606.23	509.63	257.91	103.89	949.49	1.65	23000
	II	443.78	325.68	445.86	234.55	307.64	15.46	889.61		
	III	395.97	325.66	126.25	282.63	516.17	42.88	421.62		
	Ukupno	3229.80	2459.54	1332.23	1466.49	1159.37	1463.56	2298.02		
Ca	I	76973.40	3762.50	78283.89	10463.60	13620.71	829.93	9579.74	1.08	41000
	II	20810.92	2119.12	71498.55	6453.00	9339.65	146.50	1969.56		
	III	347.03	147.67	3786.20	198.56	311.85	26.60	142.62		
	Ukupno	99821.98	10251.92	154250.35	22115.18	25586.59	14308.62	11818.19		

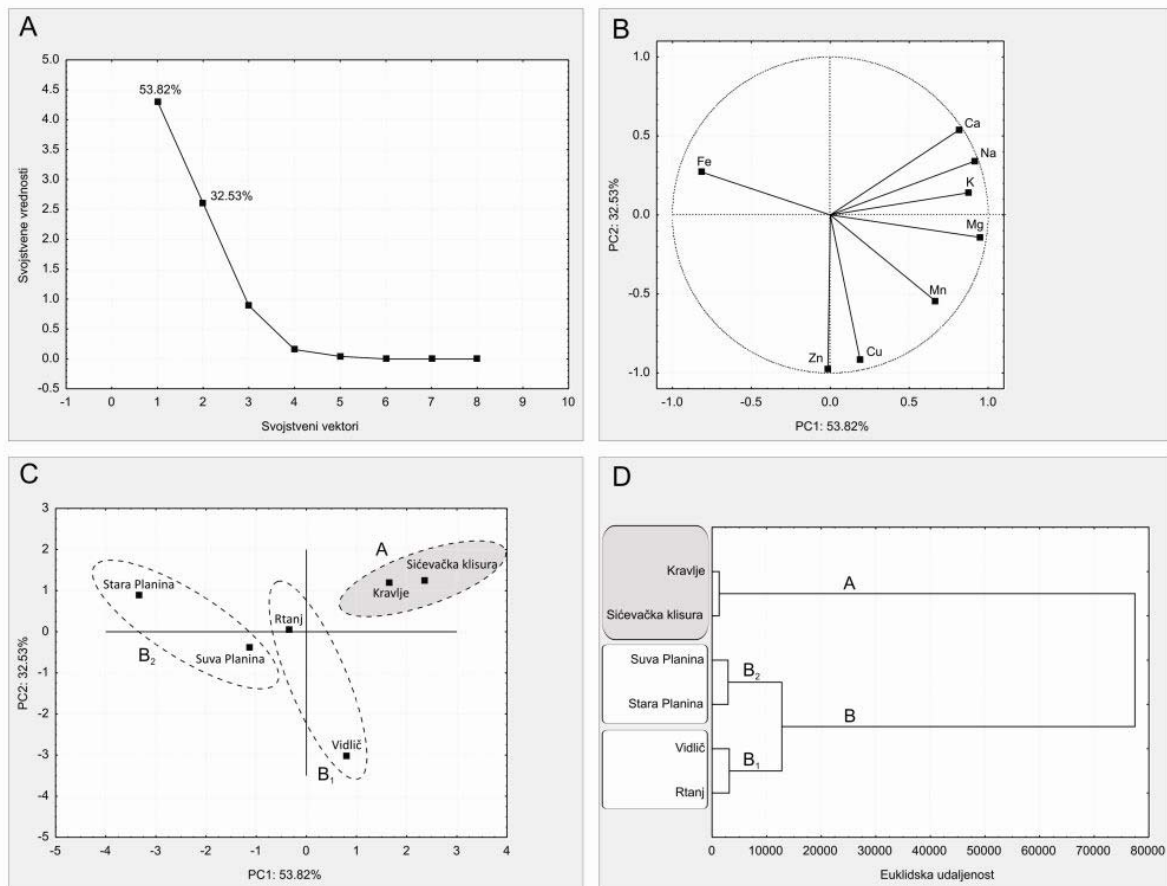
*RSD-relativna standardna devijacija koncentracije određivanih metala; **ZK-prosečan sadržaj elemenata u Zemljinoj kori (Sparks, 2003).

Tabela 3. Koncentracija prelaznih metala u zemljištu.

Element (ppm)	Frakcija (faza)	Kravlje	Suva Planina	Sićevačka klisura	Vidlič	Rtanj	Stara Planina	BCR-701 standard	RSD* (%)	ZK** (ppm)
Mn	I	207.52	252.24	227.95	305.35	263.84	4.60	178.76	0.72	950
	II	634.30	871.38	431.89	607.30	492.15	3.57	154.96		
	III	30.66	38.30	62.86	23.77	32.30	1.73	20.86		
	Ukupno	918.11	1280.25	736.86	1044.43	820.68	11.03	357.13		
Fe	I	2.08	3.04	2.83	2.60	4.83	26.63	79.75	1.68	41000
	II	1405.60	2175.01	38.62	1288.67	1459.17	315.18	7864.44		
	III	1041.95	952.50	621.47	1241.44	2184.63	101.17	1047.75		
	Ukupno	13516.51	14745.34	8156.82	15411.14	9669.43	4786.97	9143.00		
Cu	I	0.01	0.01	0.01	0.06	0.01	0.01	49.41	0.90	50
	II	0.97	1.94	1.03	0.82	1.10	0.24	116.45		
	III	2.63	1.20	2.99	3.13	2.67	0.16	51.00		
	Ukupno	16.11	11.46	5.79	17.05	10.45	2.25	218.81		
Zn	I	0.01	0.59	0.01	2.19	0.31	0.34	206.87	1.58	75
	II	17.08	6.61	2.54	22.23	13.30	0.44	111.27		
	III	8.44	6.51	13.70	14.40	14.51	5.23	42.73		
	Ukupno	40.70	25.97	23.67	54.53	42.93	8.45	366.57		

*RSD-relativna standardna devijacija koncentracije određivanih metala; **ZK-prosečan sadržaj elemenata u Zemljinoj kori (Sparks, 2003).

na dve grupe (A i B). Grupa A, zemljišta sa područija Kravlja i Sićevačke klisure, odlikovala su se izuzetno visokim sadržajem kalcijuma (Slike 5B, C). Ova zemljišta imala su i viši sadržaj izmenljivog natrijuma, kalijuma i magnezijuma u odnosu na zemljišta B grupe (Slike 5B, C).

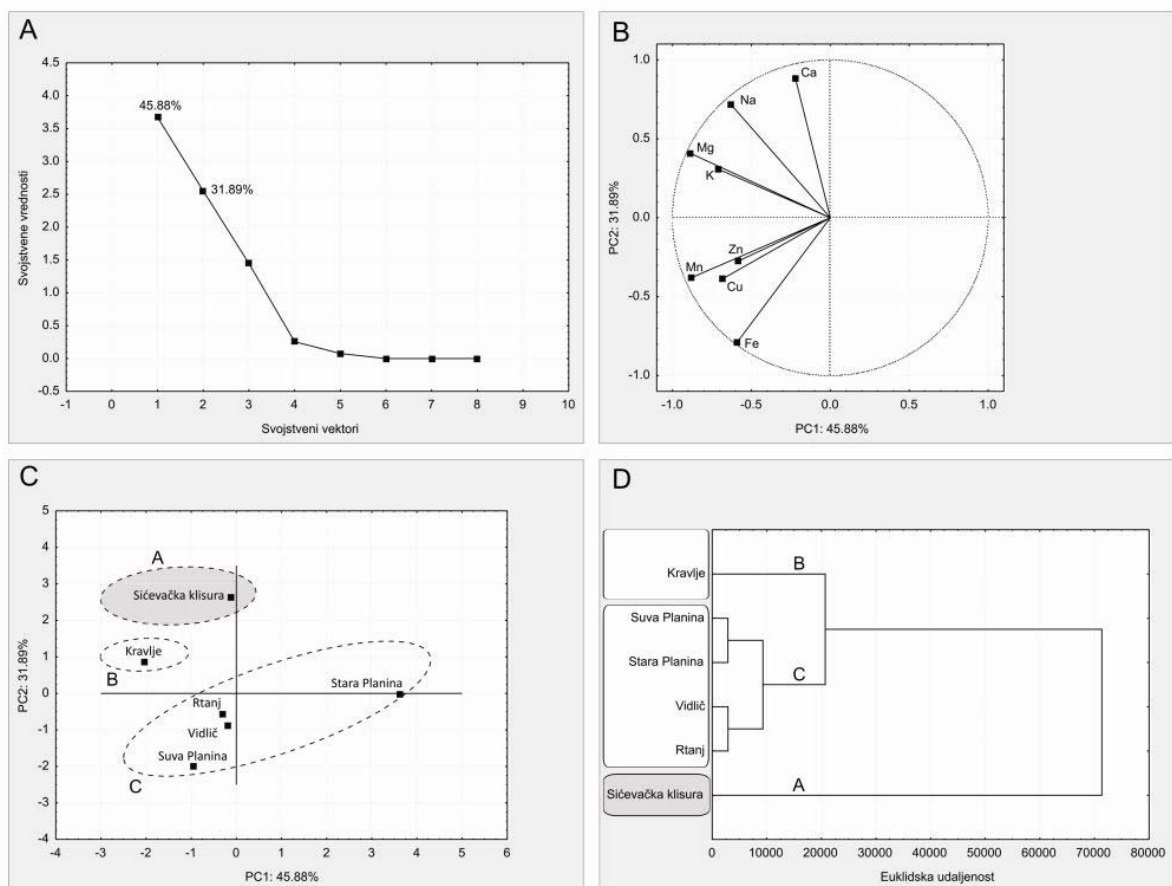


Slika 5. Hemometrijska analiza sadržaja metala karbonatne frakcije zemljišta: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih metala; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih zemljišta; (D) dendrogram HCA analize.

Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 12795 (Slika 5D), HCA analiza je podelila grupu B na dve podgrupe (B₁ i B₂). Vidlič, nosilac podgrupe B₁, odlikovao se višim vrednostima izmenljivog Mn, Cu i Zn u odnosu na ostala zemljišta. Karbonatna frakcija zemljišta sa Stare Planine (podgrupa B₂) karakterisala se visokim sadržajem gvožđa u odnosu na ostala zemljišta (Slika 5B, C). Najveću hemijsku sličnost u pogledu ispitivanih elemenata karbonatne frakcije imala su zemljišta Kravlja i Sićevačke klisure.

4.1.2. Hemometrijska analiza sadržaja metala Fe/Mn oksidne frakcije zemljišta

Rezultati studije (Kabata-Pendias, 2010), pokazali su da oksidi gvožđa i mangana imaju značajnu ulogu u sorpciji i desorpciji hemijskih vrsta u zemljištu. Cilj primene sekvencijalne BCR analize, bio je utvrđivanje koja zemljišta imaju sličnu akumulaciju u okviru Fe/Mn



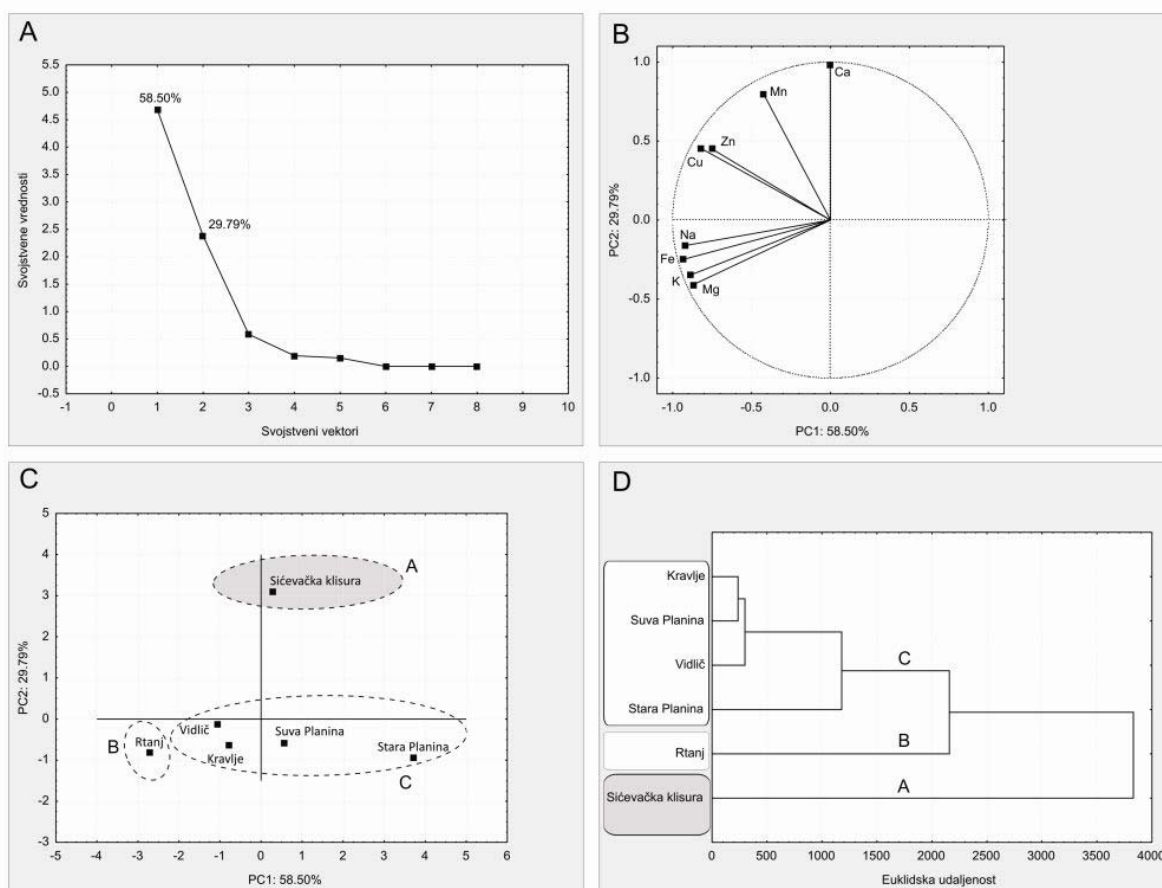
Slika 6. Hemometrijska analiza sadržaja metala Fe/Mn oksidne frakcije zemljišta: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih metala; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih zemljišta; (D) dendrogram HCA analize.

oksidne frakcije i sličan uticaj na biodostupnosti pojedinih elemenata. Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sadržaj metala Fe/Mn oksidne frakcije u cilju procene sličnosti zemljišta. Koncentracija ispitanih elemenata u ovoj frakciji (Tabele 2 i 3) kretala se u intervalu: natrijum (0.50-12.92 ppm), kalijum (74.51-286.03 ppm), magnezijum (15.46-445.86 ppm), kalcijum (146.50-71498.55 ppm), mangan (3.57-871.38 ppm), gvožđe (38.62-2175.01 ppm), bakar (0.24-1.94 ppm) i cink (0.44-22.23 ppm). Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 45.88% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 31.89% (Slika 6A). Slika 6B, ilustruje uticaj ispitanih metala Fe/Mn oksidne faze, na klasifikaciju ispitanih zemljišta (Slika 6C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 20708 (Slika 6D), HCA analiza je podelila zemljišta na tri grupe (A, B i C). Grupa A, zemljište iz Sičevačke klisure, odlikuje se izuzetno visokim sadržajem kalcijuma (Slike 6B, C). Ovo zemljište je u okviru Fe/Mn oksidne frakcije sadržalo i visok sadržaj magnezijuma. Kravlje, grupa B, odlikovalo se visokim sadržajem natrijuma i kalijuma u odnosu na ostala zemljišta (Slike 6B, C). Suva Planina, nosilac grupe

C, odlikuje se višim vrednostima Mn, Fe i Cu, dok je Zn karakterisao zemljište Vidliča u okviru iste grupe (Slike 6B, C). Najveću hemijsku sličnost u pogledu ispitivanih elemenata Fe/Mn oksidne frakcije imala su zemljišta Suve i Stare Planine.

4.1.3. Hemometrijska analiza sadržaja metala organske frakcije zemljišta

Na osnovu određenih studija, pokazano je da organska materija zemljišta igra značajnu ulogu u sorpciji i kompleksiranju hemijskih elemenata (Kabata-Pendias, 2010). Primenom sekvencionalne BCR analize, želeli smo utvrditi koja zemljišta imaju sličnu akumulaciju metala u okviru organske frakcije i sličan uticaj na biodostupnost pojedinih elemenata. Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sadržaj metala organske frakcije u cilju procene sličnosti zemljišta. Koncentracija ispitanih elemenata u ovoj frakciji (Tabele 2 i 3) kretala se u intervalu: natrijum (3.70-7.40 ppm), kalijum (27.31-127.01 ppm), magnezijum (42.88-516.17 ppm), kalcijum (26.60-3786.20 ppm), mangan (1.73-62.86 ppm), gvožđe (101.17-2184.63 ppm), bakar (0.16-3.13 ppm) i cink (5.23-14.51 ppm).

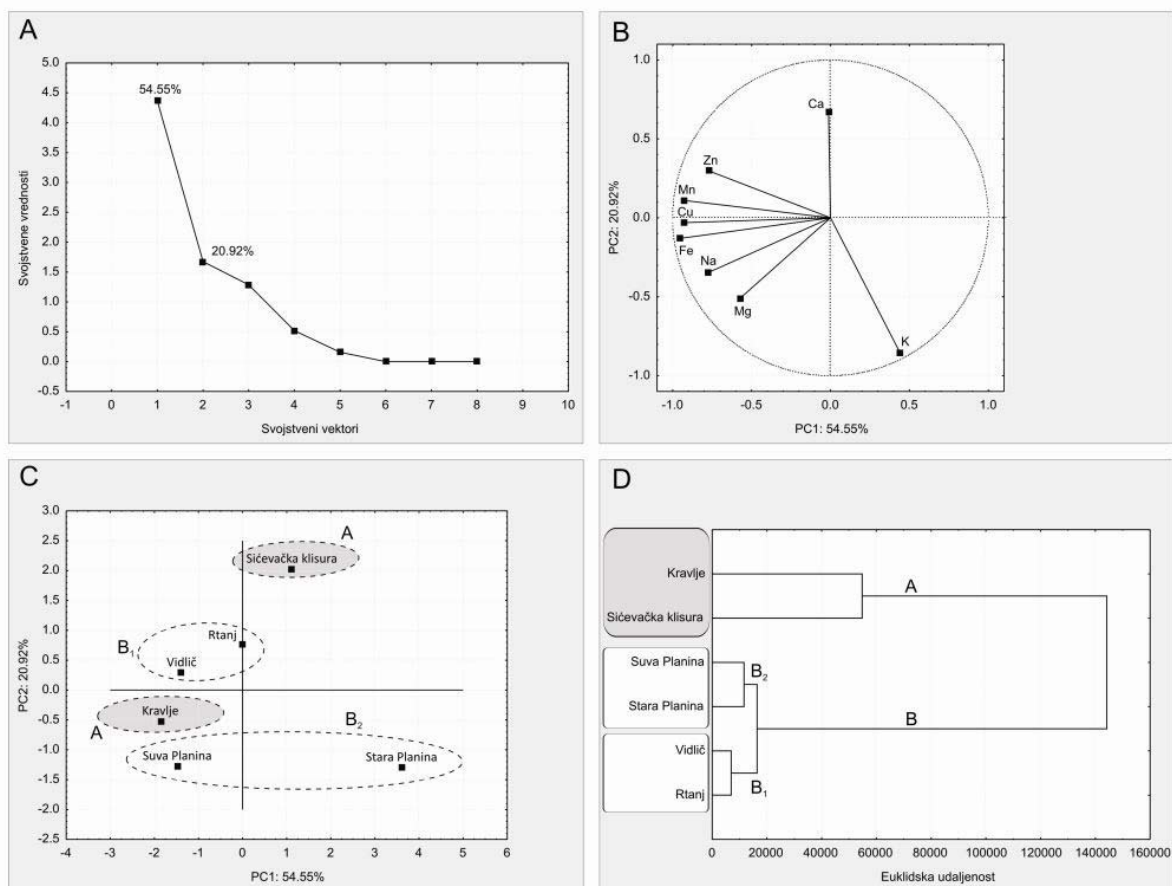


Slika 7. Hemometrijska analiza sadržaja metala organske frakcije zemljišta: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih metala; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih zemljišta; (D) dendrogram HCA analize.

Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 58.50% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 29.79% (Slika 7A). Slika 7B, ilustruje uticaj ispitanih metala organske faze, na klasifikaciju ispitanih zemljišta (Slika 7C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2158 (Slika 7D), HCA analiza je podelila zemljišta na tri grupe (A, B i C). Grupa A, zemljište iz Sićevačke klisure, odlikuje se izuzetno visokim sadržajem kalcijuma (Slike 7B, C). Ovo zemljište je u okviru organske frakcije sadržalo i visok sadržaj mangana. Rtanj, grupa B, odlikuje se višim sadržajem natrijuma, kalijuma, magnezijuma, gvožđa i cinka u odnosu na ostala zemljišta (Slike 7B, C). Zemljišta grupe C imala su niži sadržaj ispitanih metala, samo se Vidlič karakterisao nešto višim sadržajem bakra. Najveću hemijsku sličnost u pogledu ispitanih elemenata organske frakcije pokazala su zemljišta Kravlja i Suve Planine.

4.1.4. Hemometrijska analiza zemljišta na osnovu ukupnog sadržaja metala

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na ukupan sadržaj metala u zemljištu (Tabele 2 i 3). Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 54.55% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 20.92% (Slika 8A). Slika 8B, ilustruje uticaj ispitanih metala na klasifikaciju zemljišta (Slika 8C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 144202 (Slika 8D), HCA analiza je podelila zemljišta na dve grupe (A i B). Grupa A, zemljišta sa područija Kravlja i Sićevačke klisure, odlikovala su se izuzetno visokim sadržajem kalcijuma (Slike 8B, C). Visok sadržaj magnezijuma u odnosu na ostala zemljišta uočen je na područiju Kravlja. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 16416 (Slika 8D), HCA analiza je podelila grupu B na dve podgrupe (B₁ i B₂). Vidlič, nosilac podgrupe B₁, odlikovao se višim vrednostima Fe, Cu i Zn u odnosu na ostala zemljišta (Slika 8B, C). Podgrupa B₂, zemljišta sa Stare i Suve Planine, odlikovala su se visokim sadržajem Na, K i Mn (Slike 8B, C). Najveću hemijsku sličnost u pogledu ukupnog sadržaja elemenata imala su zemljišta Vidliča i Rtnja. Poređenjem hemometrijskih rezultata koji se odnose na sadržaj metala u zemljištu, uočena je sličnost dendrograma karbonatne frakcije i ukupne koncentracije. Na osnovu ukupne i frakcionih koncentracija metala (Tabele 2 i 3), uočavamo izražen procenat metala u obliku silikata. Na osnovu određenih studija, pokazano je da metali silikatne frakcije nisu biodostupni biljci i ne mogu uticati na njen rast (Kabata-Pendias, 2010). Zanimajući ovu bio-inertnu frakciju, hemometrijskom analizom je pokazan snažan uticaj karbonatne frakcije na biodostupnost metala zemljišta (Slike 5D-8D).



Slika 8. Hemometrijska analiza ukupnog sadržaja metala zemljišta: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih metala; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih zemljišta; (D) dendrogram HCA analize.

4.1.5. Hemometrijska analiza stepena zasićenja zemljišta (EF)

Stepen zasićenja zemljišta (EF), detaljno je opisan u studiji Loska & Wiechula (2003) a jednačina njegovog proračuna data je izrazom:

$$EF = \frac{\left(\frac{C_x}{C_{Fe}}\right)_{\text{zemljište}}}{\left(\frac{C_x}{C_{Fe}}\right)_{\text{Zemljina kora}}}$$

gde je:

$\left(\frac{C_x}{C_{Fe}}\right)_{\text{zemljište}}$ odnos koncentracije ispitano elementa i gvožđa u analiziranom zemljištu,

$\left(\frac{C_x}{C_{Fe}}\right)_{\text{Zemljina kora}}$ odnos koncentracije ispitano elementa i gvožđa u Zemljinoj kori

Stepen zasićenja je našao značajnu ulogu u geohemijskoj analizi zemljišta u vidu brzog uočavanja prirodnih (raspad stena) i veštačkih faktora (antropogeni uticaj) akumulacije metala u biljkama (Mohamed & Antia, 1998; Kabata-Pendias, 2010; Adaikpoh & Kaizer,

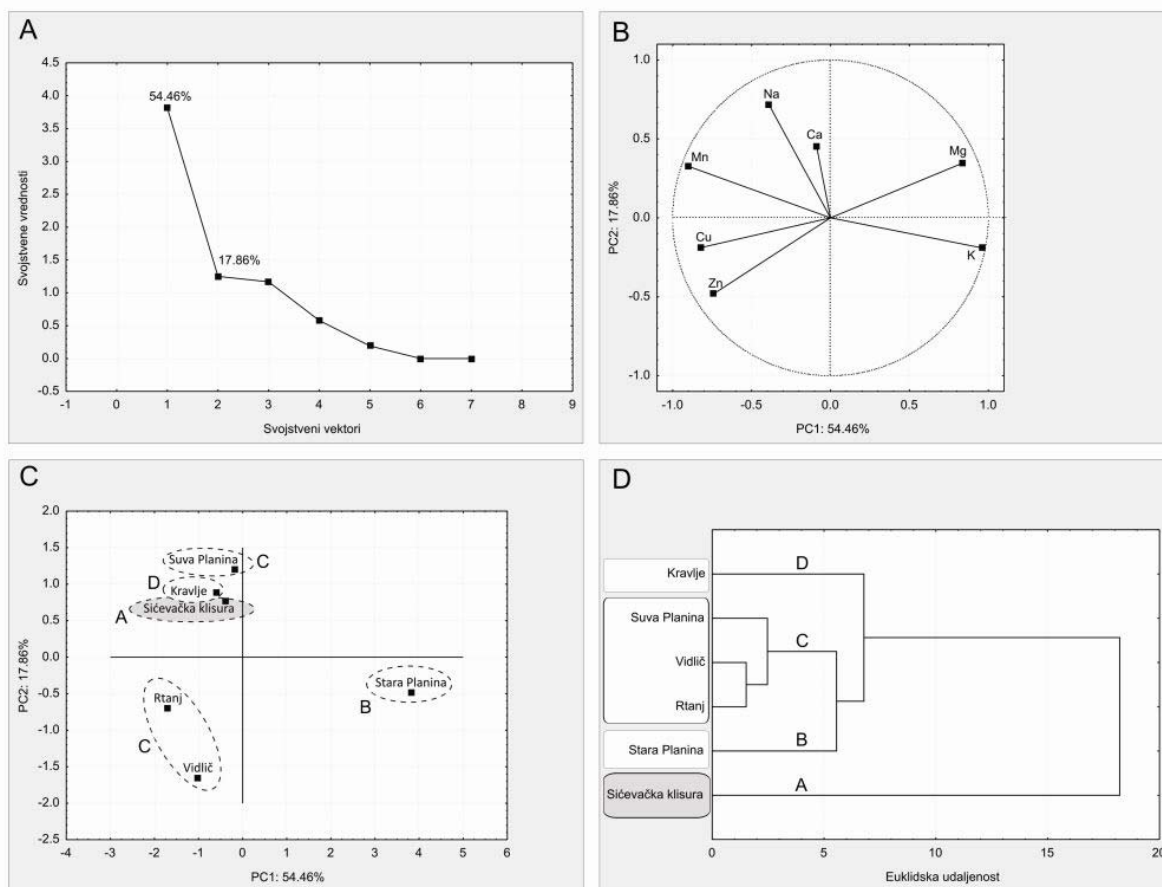
2012; Ren et al., 2014). Na osnovu sadržaja ispitanih elemenata u Zemljinoj kori i njihove koncentracije u zemljištu (Tabele 2 i 3), određen je stepen zasićenja za sve elemente.

Tabela 4. Stepen zasićenja zemljišta (EF) ispitanim elementima.

Element	Kravlje	Suva Planina	Sićevačka klisura	Vidlič	Rtanj	Stara Planina
Na	0.29	0.29	0.16	0.09	0.23	0.11
K	0.99	0.97	0.97	0.85	1.01	4.44
Mg	0.43	0.30	0.29	0.17	0.21	0.54
Ca	7.39	0.70	18.91	1.44	2.65	2.99
Mn	2.95	3.77	3.93	2.95	3.69	0.10
Fe	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cu	0.99	0.65	0.59	0.92	0.90	0.39
Zn	1.67	0.98	1.61	1.97	2.47	0.98

Prema pojedinim studijama (Loska & Wiechula, 2003), na osnovu vrednosti stepena zasićenja, zemljišta možemo podeliti na: a) minimalno obogaćena ($EF < 2$), b) umereno obogaćena ($2 \leq EF < 5$), c) značajno obogaćena ($5 \leq EF < 20$), d) jako obogaćena ($20 \leq EF \leq 40$) i e) ekstremno obogaćena ($EF > 40$). Na osnovu rezultata u Tabeli 4, uočavamo da zemljišta u odnosu na većinu elemenata spadaju u minimalno obogaćena zemljišta. Takođe se uočava umereno i značajno obogaćenje zemljišta kalijumom, kalcijumom, manganom i cinkom. Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve vrednosti stepena zasićenja u cilju procene sličnosti zemljišta na osnovu akumulacije metala. Primena hemometrijskih metoda u analizi i ispitivanju EF vrednosti zemljišta je predmet pojedinih studija (Loska & Wiechula, 2003; Chen et al., 2014). Ispitane EF vrednosti elemenata (Tabela 4), kretale su se u intervalu: natrijum (0.09-0.29), kalijum (0.85-4.44), magnezijum (0.17-0.54), kalcijum (0.70-18.91), mangan (0.10-3.93), bakar (0.39-0.99) i cink (0.98-2.47). Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 54.46% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 17.86% (Slika 9A). Slika 9B, ilustruje uticaj EF vrednosti metala na klasifikaciju ispitanih zemljišta (Slika 9C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 5.6 (Slika 9D), HCA analiza je podelila zemljišta na četiri grupe (A, B, C i D). Grupa A, zemljište iz Sićevačke klisure, odlikuje se znatnim obogaćenjem Ca i Mn u odnosu na ostala zemljišta (Slike 9B, C). Stara Planina (grupa B), može se smatrati zemljištem umereno obogaćeno kalijumom. Ovo zemljište je sadržalo i najviše EF vrednosti magnezijuma ali u granici minimalnog obogaćenja (Slike 9B, C). Rtanj, nosilac grupe C, odlikuje se umerenim obogaćenjem u pogledu sadržaja Zn (Slike 9B, C). Najviše EF vrednosti Na i Cu uočene su u zemljištu Kravlja ali samo u oblasti minimalnog obogaćenja (Slike 9B, C). Najveću hemijsku sličnost u pogledu stepena zasićenja elemenata imala su

zemljišta Vidliča i Rtnja. U cilju objašnjenja mineralnog obogaćenja zemljišta i eliminacije mogućeg antropogenog faktora, izvršena je detaljna X-ray difrakciona analiza uzoraka zemlje.



Slika 9. Hemometrijska analiza zemljišta zasnovana na stepenu zasićenja: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih metala; (C) rezultujućí PCA dijagram ispitanih zemljišta; (D) dendrogram HCA analize.

4.1.6. X-ray difrakciona (XRD) i hemometrijska analiza mineralnog sastava zemljišta

Sadržaj metala u zemljištu, a samim tim i njihova dostupnost biljci, određena je prisustvom primarnih i sekundarnih minerala. Primarne minerale zemljišta na osnovu sposobnosti fizičke, hemijske i biološke razgradnje možemo podeliti u dve grupe: a) felzični minerali: plagioklas > K/Na-feldspat > muskovit > kvarc i b) mafični minerali: olivin > piroksen > amfibol > biotit (Kabata-Pendias, 2010). Mafični minerali se odlikuju višim sadržajem Mg i Fe u odnosu na felzične minerale čije su glavne komponente Si, O, Al, Na i K. Primarni minerali su karakteristika zemljišta krupnije teksture i nisu značajno uključeni u proces sorpcije jona u zemljištu. Pedohemijskom i geohemijskom modifikacijom primarnih minerala nastaju sekundarni minerali kao što su: minerali glina, kalcit, dolomit, gips, getit, hematit, gipsit i drugi. Svi sekundarni minerali, a naročito minerali glina (grupe kaolina, smektita, ilita i hlorita) igraju važnu ulogu u procesu sorpcije jona koja je uslovljena pH i Eh vrednošću

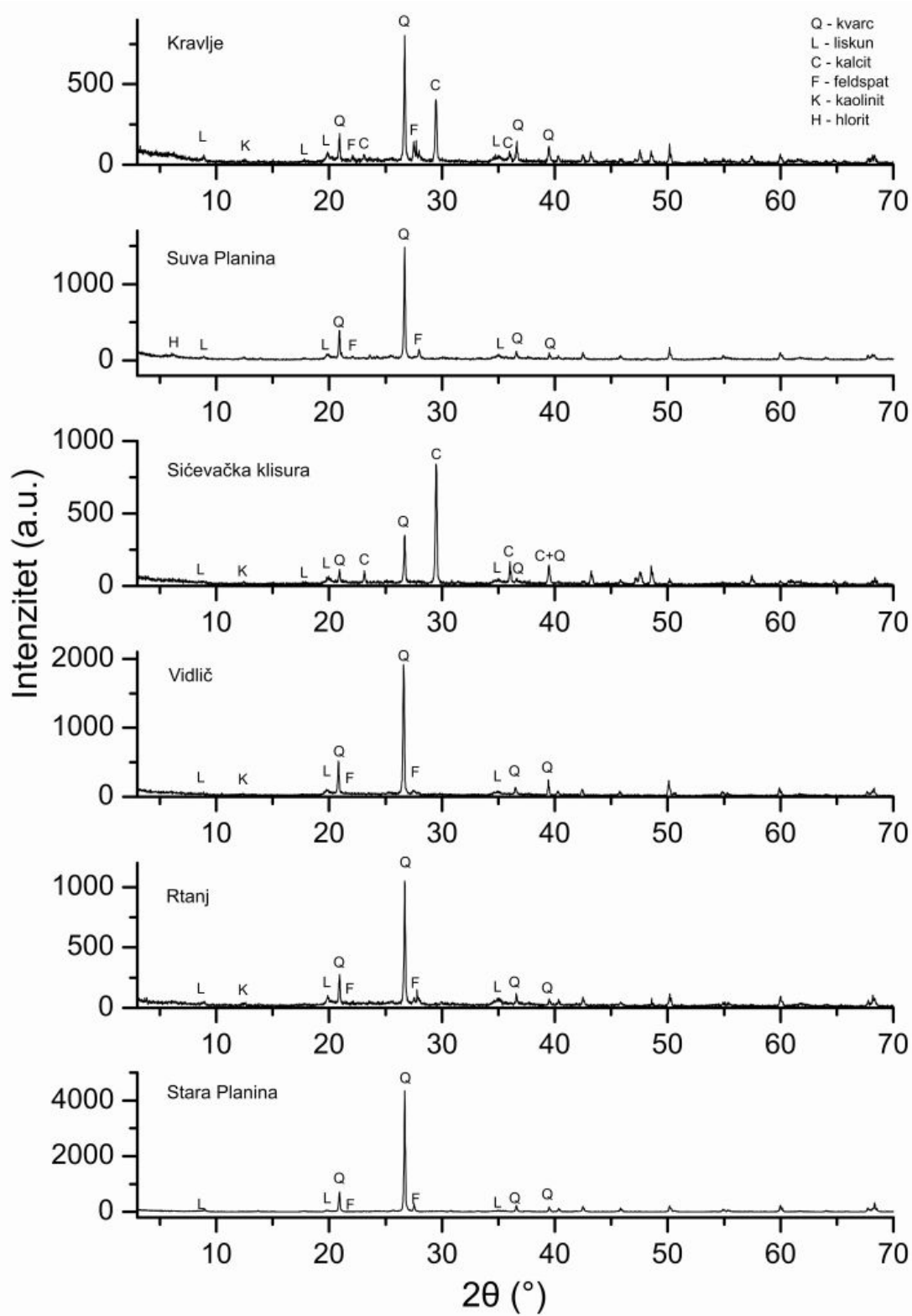
zemljišta (Kabata-Pendias, 2010). Pojedine studije su pokazale da je kvarc najzastupljeniji mineral zemljišta i da je najmanje rastvoran ($\text{pH} > 9$) u odnosu na ostale silikatne minerale (Tan, 1998). Minerali feldspata su podložni rapadanju i transformaciji u zemljištu i daju odličan materijal za nastanak minerala glina. Zemljišta suvih klimatskih područja, odlikuju se višim sadržajem karbonata (kalcit, dolomit) i metalnih oksida/hidroksida, dok su glinovita zemljišta fine teksture, karakteristika vlažnog klimatskog podneblja (Sparks, 2003).

X-ray difrakciona metoda (XRD) je nedestruktivna i najkorišćenija tehnika za identifikaciju mineralnih komponenata zemljišta. Svaki mineral se karakteriše specifičnim rasporedom atoma, stvarajući atomske ravni, koje su sposobne da difraktuju (reflektuju) X-zrake pod određenim uglom. Karakteristične vrednosti difrakcionih uglova i implementacija Bragove jednačine omogućava identifikovanje minerala (Tan, 1998). Na osnovu XRD analize (Slika 10), određeni su sledeći minerali u zemljištu: a) primarni minerali: kvarc $\{\text{SiO}_2\}$, liskun $\{\text{KAl}_3(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{F},\text{OH})_2\}$ i feldspat $\{\text{KAlSi}_3\text{O}_8 - \text{NaAlSi}_3\text{O}_8 - \text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8\}$, b) sekundarni minerali: kalcit $\{\text{CaCO}_3\}$, kaolinit $\{\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4\}$ i hlorit $\{(\text{Mg}_5\text{Al})(\text{AlSi}_3)\text{O}_{10}(\text{OH})_8\}$.

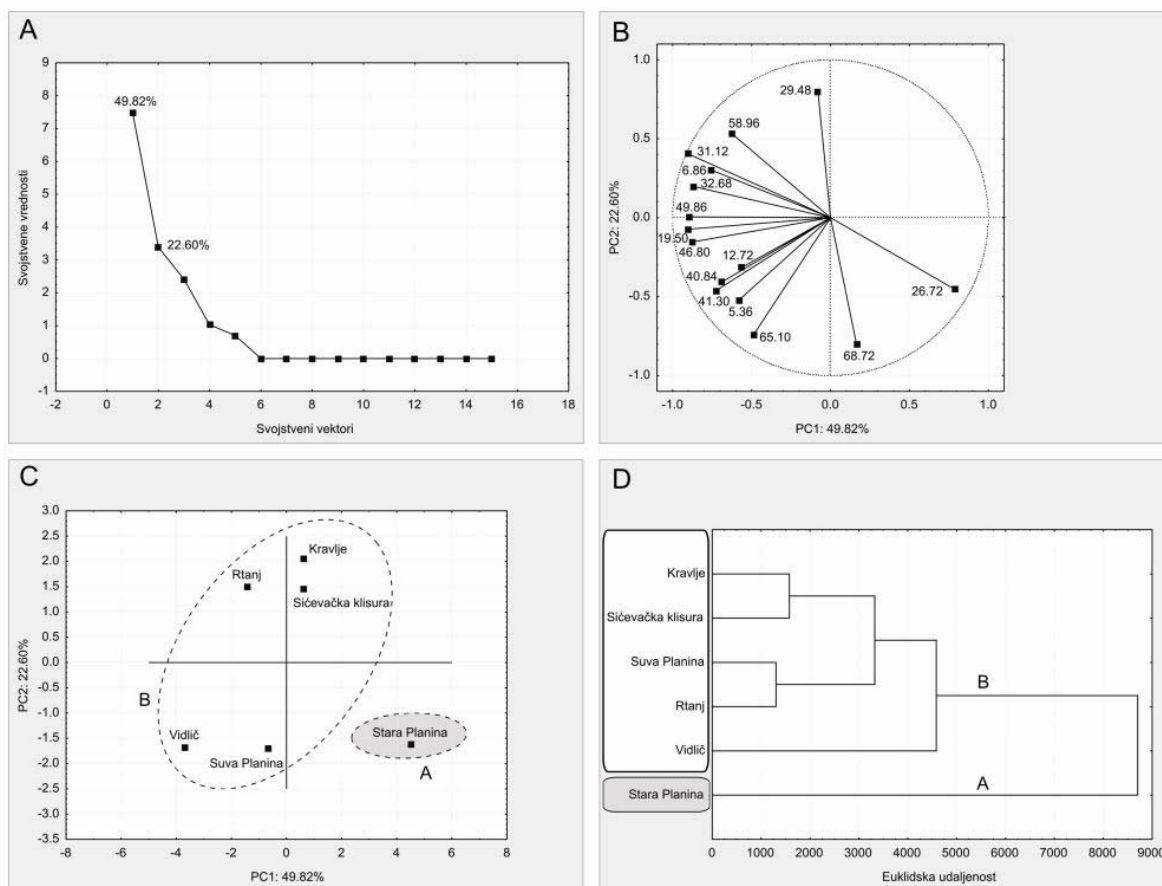
Na osnovu XRD analize uočava se dominantno prisustvo kvarca u svim uzorcima. Kao što je već napomenuto, sam kvarc je prilično inertan na pH i Eh vrednosti zemljišta i tako reći ne učestvuje u sorpciji jona u zemljištu (Tan, 1998). Sa druge strane uočava se dominantno prisustvo kalcita na području Kravlja i Sićevačke klisure, što upravo objašnjava značajno obogaćenje ($5 \leq \text{EF} < 20$) ovih zemljišta kalcijumom i eliminiše antropogeni uticaj njegove akumulacije. Većina zemljišta sadržala je i izvesnu količinu glinenih minerala koji zajedno sa karbonatima zavisno od Eh-pH vrednosti, igraju značajnu ulogu u sorpciji i desorpciji jona (Tan, 1998; Sparks, 2003; Kabata-Pendias, 2010). Primarni minerali podložni gohemijskom raspadu, feldspati i liskuni, mogu biti odgovorni za akumulaciju pojedinih jona (Tan, 1998).

Hemometrijske metode su našle primenu u instrumentalnoj analitičkoj hemiji u vidu analize i poređenja spektara ispitivanih supstanci (Klein et al., 2012; Miladinović et al., 2012; Mueller et al., 2013). Primena PCA i HCA analize u ispitivanju zemljišta na osnovu XRD vrednosti je predmet pojedinih studija (Zhu et al., 2004; Padeletti & Fermo, 2010).

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na mineralni sastav zemljišta u cilju određivanja njihovih sličnih mineraloških karakteristika. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 49.82% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 22.60% (Slika 11A). Slika 11B, ilustruje uticaj karakterističnih difrakcionih uglova faktorske analize, na klasifikaciju ispitanih zemljišta (Slika 11C).



Slika 10. XRD spektri ispitanih uzoraka zemlje.



Slika 11. Hemometrijska analiza zemljišta zasnovana na mineralnom sastavu: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih difrakcionih uglova; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih zemljišta; (D) dendrogram HCA analize. Ispitan mineralni sastav zemljišta prikazan je na Slici 10.

Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 4585 (Slika 11D), HCA analiza je podelila zemljišta na dve grupe (A i B). Grupa A, zemljište sa područja Stare Planine, odlikuje se izraženim sadržajem kvarca i niskim sadržajem ostalih minerala u odnosu na ispitana zemljišta. Karakterističan difrakcioni ugao kvarca (26.72°) i odsutne/zanemarljive vrednosti uglova ostalih minerala su potvrda ove konstatacije (Slike 10 i 11B, C). U okviru zemljišta grupe B, uočava se mineralna sličnost Kravlja i Sičevačke klisure usled izraženog sadržaja kalcita i difrakcionog ugla (29.48°). Sva zemljišta grupe B odlikuju se prisustvom glinenih minerala i nešto višim sadržajem feldspata i liskuna u odnosu na zemljište Stare Planine. Najveću hemijsku sličnost u mineralološkom pogledu imaju zemljišta Suve Planine i Rtnja (Slika 11D).

4.1.7. Hemijski parametri zemljišta

Na osnovu brojnih studija, ispitivanja i analiza (Tan, 1998; Sparks, 2003; Kabata-Pendias, 2010), glavni parametri zemljišta koji regulišu proces sorpcije i desorpcije jona u zemljištu, a

samim tim utiču na njihovu dostupnost biljci su: a) kiselost zemljišta (pH), b) elektrodni potencijal zemljišta (Eh), c) električna provodljivost zemljišta (EC), d) katjonski izmenjivački kapacitet zemljišta (CEC), i e) sadržaj organske materije.

Na osnovu stepena kiselosti/baznosti, zemljišta možemo podeliti na: a) ekstremno kisela (pH < 3), b) vrlo jako kisela (3 < pH < 4), c) jako kisela (4 < pH < 5), d) umereno kisela (5 < pH < 6), e) slabo kisela (6 < pH < 7), f) neutralna (pH 7), g) slabo bazna (7 < pH < 8), h) umereno bazna (8 < pH < 9), i) jako bazna (9 < pH < 10), j) vrlo jako bazna (10 < pH < 11) i k) ekstremno bazna (pH > 11). Kisela zemljišta su uglavnom karakteristika vlažnih klimatskih predela. Većina biljnih vrsta najbolje uspeva na zemljištu slabo kiselih uslova, dok pri pH < 6, dostupnost pojedinih nutrijenata biljci može biti umanjeno. Dostupnost Ca, Mg i K, je naročito smanjeno u uslovima kisele sredine. Visoke koncentracije Fe i Mn usled jake kiselosti zemljišta su uglavnom toksične po biljku. Bazna zemljišta su uglavnom karakteristika suvih klimatskih predela. Zbog baznosti zemljišta, količine rastvornih formi Fe i Mn su male, usled njihove precipitacije u obliku nerastvornih hidroksida. Ispitani mikronutrijenti (Mn, Fe, Cu i Zn) su već u uslovima umerene alkalnosti zemljišta obično deficitarni za rast biljaka. Uopšte, visoke pH vrednosti zemljišta i dostupnost Ca su međusobno povezane. Ispostavilo se da su kiselost zemljišta i njegov elektrodni potencijal negativno korelirani (Bohrerova et al., 2004). Uticaj organske materije na pH vrednost zemljišta detaljno je opisan u studiji Brady and Weil (2010). Rezultati pH vrednosti ispitanih zemljišta dati su u Tabeli 5. Na osnovu rezultata možemo uočiti da su zemljišta Kravlja, Sićevačke klisure i Vidliča slabo bazna dok su ostala ispitana zemljišta kisela. Jako kisela sredina zemljišta Stare planine, može biti odgovorna za hiperakumulaciju i toksični efekat jona Fe i Mn u biljnim vrstama ovog područja.

Tabela 5. Ispitani hemijski parametri zemljišta.

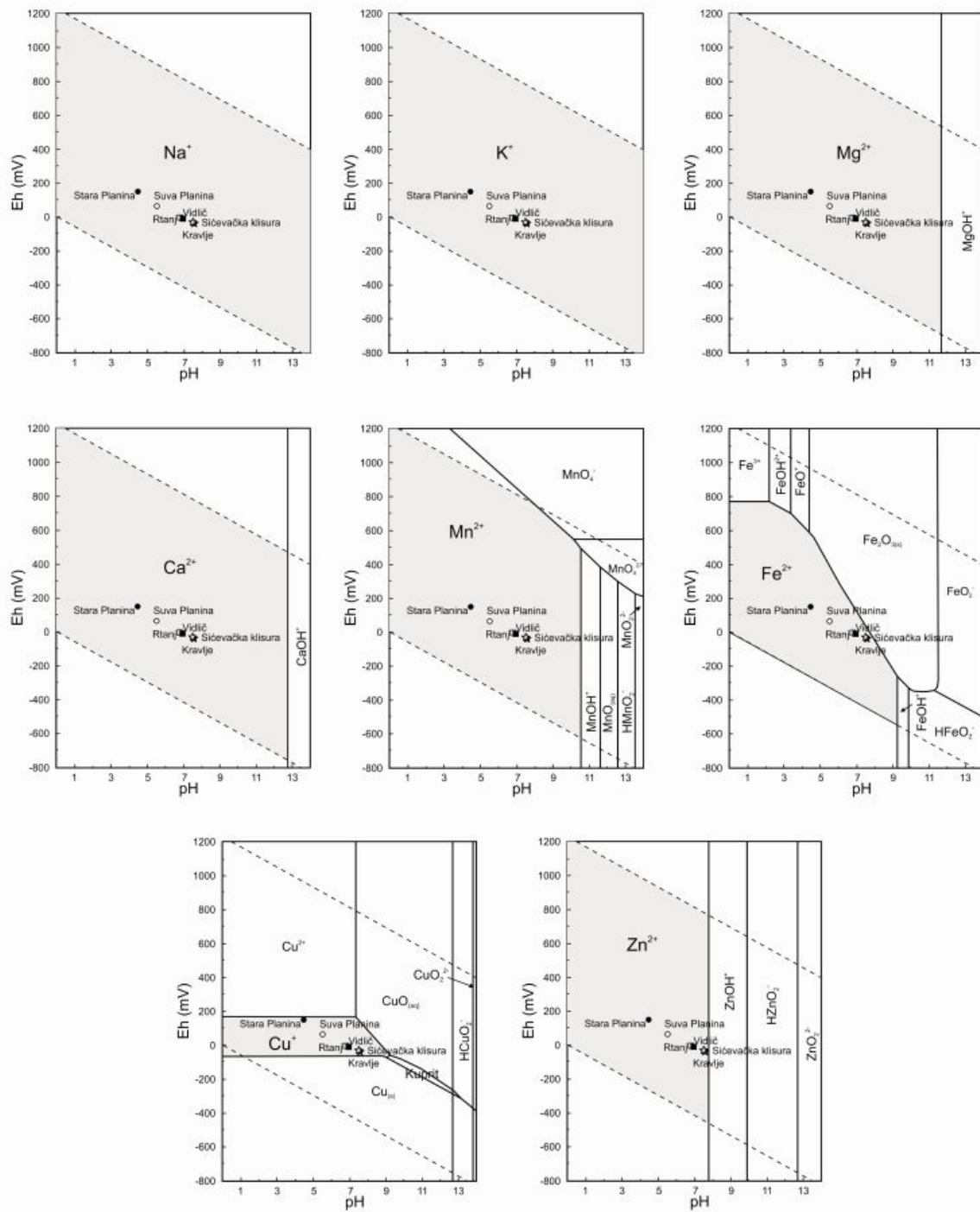
Zemljište	pH	Eh (mV)	EC (μ S/cm)	CEC (cmol _c /kg)	Pepeo (%)
Kravlje	7.64 ± 0.3	-47.0 ± 2.0	250.0 ± 2.0	543.67 ± 6.31	73.29
Suva Planina	5.64 ± 0.2	72.0 ± 3.0	103.0 ± 2.0	90.52 ± 4.58	85.73
Sićevačka klisura	7.58 ± 0.3	-45.0 ± 2.0	321.0 ± 3.0	792.69 ± 8.78	62.08
Vidlič	7.02 ± 0.2	-10.0 ± 1.0	206.0 ± 2.0	140.08 ± 4.96	75.61
Rtanj	6.88 ± 0.2	-2.0 ± 0.1	254.0 ± 2.0	150.40 ± 4.57	70.09
Stara Planina	4.65 ± 0.2	130.0 ± 3.0	33.0 ± 1.0	111.61 ± 3.23	97.72

Na osnovu pojedinih studija, elektrodni potencijal zemljišta se obično kreće u intervalu od -300 mV do 900 mV (Huson, 2013). Na osnovu elektrodnog potencijala, zemljišta možemo

podeliti na: a) zemljišta bogata kiseonikom ($Eh > 400$ mV), b) umereno redukciona zemljišta ($100 \text{ mV} < Eh < 400 \text{ mV}$), c) redukciona zemljišta ($-100 \text{ mV} < Eh < 100 \text{ mV}$) i d) jako redukciona zemljišta ($-300 \text{ mV} < Eh < -100 \text{ mV}$). Na osnovu rezultata datih u Tabeli 5, uočavamo da većina ispitanih zemljišta spada u zemljišta redukcionog tipa. Zemljište Stare Planine odlikuje se nešto višim vrednostima Eh potencijala, što ga svrstava u grupu umereno redukcionih zemljišta. Pojedina istraživanja su pokazala, da Eh zemljišta lako varira sa rastojanjem i dubinom zemljišnih uzoraka (Bohrerova et al., 2004; Hinsinger et al., 2009). Pojedina istraživanja su pokazala sezonsku varijaciju u elektrodnom potencijalu zemljišta usled promene klimatskih uslova i vlažnosti zemljišta (Sabien et al., 2010). Pokazano je da porast organske materije u zemljištu utiče na smanjenje elektrodnog potencijala zemljišta usled njene oksidacije kiseonikom (Macías & Camps Arbestain, 2010). Eh i pH faktori zemljišta snažno utiču na mobilnost metalnih jona u zemljištu i na njihovu biodostupnost biljci (Huson, 2013). Na osnovu elektrodnih potencijala i kiselosti zemljišta (Tabela 5), kreirani su odgovarajući Eh-pH dijagrama ispitanih elemenata (Slika 12). Na osnovu Slike 12, uočava se redukovana forma ispitanih elemenata koja ih čini biodostupnim biljci. Ova konstatacija se ne odnosi na natrijum i kalijum koji se isključivo javljaju kao jednovalentni. Vidimo da više pH vrednosti pojedinih zemljišta nisu dovele do taloženja jona u obliku hidroksida, i samim tim smanjile njihovu biodostupnost. Međutim, redukovane forme ispitanih metala mogu imati toksičan uticaj na biljnu vrstu usled izražene hiperakumulacije (Kabata-Pendias, 2010).

Slana zemljišta su karakteristika suvog klimatskog područja. Usled obilnog isparavanja i male količine padavina, dolazi do akumuliranja pojedinih soli (NaCl , Na_2SO_4 , CaCO_3 , MgCO_3) koje zemljište mogu učiniti slanim. Električna provodljivosti zemljišta (EC) je odličan indikator ove pojave. Na osnovu pojedinih istraživanja, zemljišta se tretiraju slanim ukoliko je $EC > 4000 \mu\text{S}/\text{cm}$ (Tan, 1998). Slana zemljišta, snažno inhibiraju rast biljaka, usled indukcije plazmolize i istiskivanja vode iz biljaka u zemljišni rastvor. Na osnovu rezultata električne provodljivosti (Tabela 5) uočavamo da sva ispitana zemljišta spadaju u grupu neslanih zemljišta i da toksični efekti slanosti ne mogu uticati na biljne vrste ovih predela.

Katjonski izmenjivački kapacitet (CEC) zemljišta se odnosi na količinu negativnog naelektrisanja prisutnog na površini minerala glina i organske materije koja elektrostatičkim silama drži pozitivno naelektrisane jone zemljišnog rastvora (Sparks, 2003). Veći sadržaj organske materije i glinenih minerala u zemljištu uslovljava i više CEC vrednosti. Visoka CEC vrednost ne znači i veću plodnost zemljišta, pošto negativna mesta mogu biti zauzeta i kiselim H^+ i Al^{3+} jonima. Samo mali procenat esencijalnih katjona se nalazi slobodan u



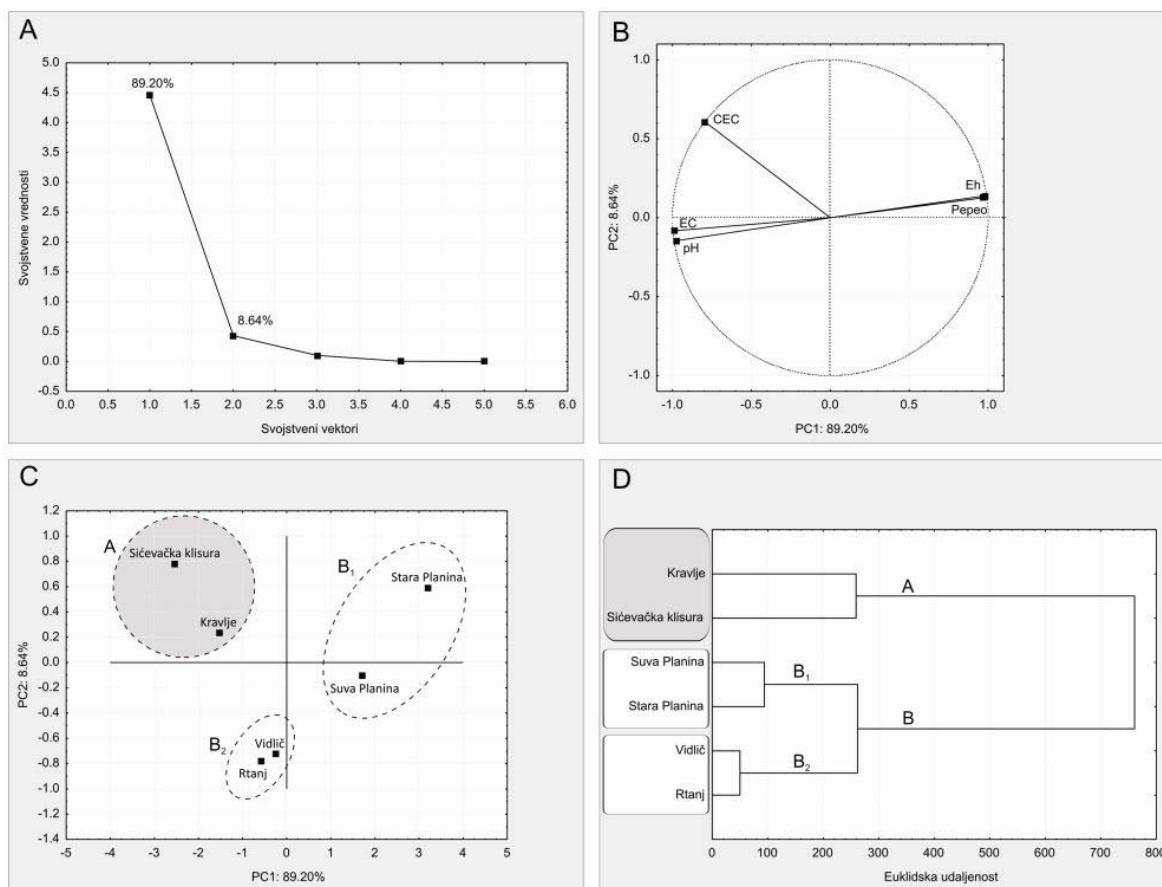
Slika 12. Eh-pH dijagrami ispitanih metala.

u zemljišnom rastvoru. Katjonski izmenjivački kapacitet predstavlja rezervoar nutrijenata kojim se nadoknađuju potrošeni metali zemljišnog rastvora usled biljne apsorpcije ili izluživanja u periodu obilnih padavina. CEC igra važnu ulogu u puferovanju pH zemljišta, a u kombinaciji sa ostalim parametrima zemljišta može biti dobar indikator plodnosti zemljišta. Na osnovu rezultata (Tabela 5), najviše vrednosti katjonsko izmenjivačkog kapaciteta uočene su na području Kravlja i Sićevačke klisure a najniže na području Suve i Stare Planine. Ova pojava se može objasniti visokim sadržajem organske materije i mineralnim sastavom (Tabela 5, Slika 10) ispitanih zemljišta. (Tan, 1998, Sparks 2003, Kabata-Pendias, 2010).

Organska materija je jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na elektroodni potencijal zemljišta. Ona je elektronski rezervoar redukcionog kapaciteta i njen unos snižava vrednost potencijala (Chesworth, 2004). Pokazano je da organske materije imaju važnu ulogu u održavanju pH vrednosti i nastajanju slabo kisele i neutralne sredine zemljišta (Brady & Weil, 2010). Pri niskim pH vrednostima, organska materija gradi stabilne komplekse sa Al, što je najvažniji puferski proces zemljišta (Skylberg et al., 2001). Kao što je već napomenuto, veći udeo organske materije značajno utiče na povećanje katjonsko izmenjivačkog kapaciteta zemljišta. Pokazano je da organske supstance (huminske i fulvo kiseline) igraju važnu ulogu u kompleksiranju i geohemijskom ciklusu metala (Kabata-Pendias, 2010; Tang et al., 2014). Jedna od čestih metoda određivanja količine organske materije je analiza pepela spaljenog zemljišta. Na osnovu rezultata (Tabela 5), uočavamo nizak sadržaj organske materije na području Stare Planine i znatno više vrednosti u ostalim uzorcima.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na hemijske parametre zemljišta u cilju određivanja sličnih zemljišnih uslova. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 89.20% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 8.64% (Slika 13A). Slika 13B, ilustruje uticaj hemijskih parametara, na klasifikaciju ispitanih zemljišta (Slika 13C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 761 (Slika 13D), HCA analiza je podelila zemljišta na dve grupe (A i B). Grupa A, zemljišta sa područja Kravlja i Sićevačke klisure, odlikuju se višim vrednostima pH, EC, CEC i nižim vrednostima Eh i pepela u odnosu na ostala zemljišta grupe B (Slika 13B, C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 262 (Slika 13D), HCA analiza je podelila grupu B na dve podgrupe (B₁ i B₂). Zemljišta Stare i Suve Planine (podgrupa B₁), odlikuju se višim vrednostima Eh i pepela u odnosu na ostala zemljišta grupe B (Slika 13B, C). Najveću hemijsku sličnost u pogledu svih hemijskih parametara imaju zemljišta Vidliča i Rtnja (Slika 13D). Na osnovu hemometrijske analize potvrdili smo neke od literaturnih konstatacija vezane za međusobnu povezanost hemijskih parametara zemljišta: a) negativna korelacija pH i Eh vrednosti zemljišta, b)

negativna korelacija Eh i sadržaja organske materije i c) pozitivna korelacija CEC i sadržaja organske materije (Slika 13B).



Slika 13. Hemometrijska analiza zemljišta zasnovana na hemijskim parametrima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih parametara; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih zemljišta; (D) dendrogram HCA analize.

4.2. Sadržaj metala u ispitanim biljnim vrstama

Sadržaj makro i mikro elemenata ispitanih biljaka dat je u Tabeli 6. Na osnovu rezultata vidimo da su analizirani nadzemni kao i pojedinačni delovi biljnih vrsta istih ili različitih familija na području istih ili različitih lokaliteta. Ovako postavljen sistem nam upravo može pružiti informaciju: a) da li isti delovi biljke slično/različito akumuliraju pojedine metale (*L. montana*, *P. longifolium* i *I. graveolens*), b) da li ista biljka u toku vegetacione sezone vrši sličnu/različitu akumulaciju metala (*S. kitaibelii*), c) da li biljne vrste istog roda a različitog geografskog položaja imaju sličnu/različitu akumulaciju metala (*T. glabrescens*/*T. pulegioides* i *P. longifolium*/*P. officinale*), d) da li biljne vrste iste familije i istog geografskog položaja imaju sličnu/različitu akumulaciju metala (*T. pulegioides*/*N. nuda*), e) da li biljne vrste iste familije a različitog geografskog položaja imaju sličnu/različitu akumulaciju metala, f) da li biljne vrste različite familije a istog geografskog položaja imaju sličnu/različitu

Tabela 6. Koncentracije metala (ppm) u nadzemnim i pojedinačnim delovima ispitanih biljaka.

Planina	Br.	Biljka	Na	K	Mg	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
Kravlje	1*	<i>T. glabrescens</i>	3.20	9848.73	1624.03	8755.53	21.18	88.43	4.16	21.17
Suva	2*	<i>T. pulegioides</i>	6.55	7805.78	3609.30	9638.73	18.24	123.90	3.67	25.49
Planina	3*	<i>N. nuda</i>	1.64	8659.51	1311.44	6988.03	34.49	39.23	4.25	15.85
Sícevačka klisura	4*	<i>S. kitaibelii</i> (12.5.2011. god.)	14.28	8435.91	2349.86	10678.63	18.85	107.10	3.52	18.16
	5*	<i>S. kitaibelii</i> (17.7.2011. god.)	14.87	5911.65	2277.49	11717.72	16.06	45.73	2.60	11.41
	6*	<i>S. kitaibelii</i> (14.8.2011. god.)	6.17	5789.57	2446.64	12292.58	19.85	50.40	2.76	15.56
	7*	<i>S. kitaibelii</i> (28.9.2011. god.)	11.93	4663.23	3101.19	17455.03	19.85	85.29	2.25	16.08
	8*	<i>S. kitaibelii</i> (02.11.2011. god.)	27.13	4739.60	2994.59	15929.54	19.62	95.20	2.39	14.96
Vidlič	9*	<i>L. montana</i> (list)	6.33	8011.79	2199.26	10545.32	36.35	42.82	6.03	22.35
	10*	<i>L. montana</i> (cvet)	10.82	8615.59	2170.32	11051.55	36.71	73.48	6.61	24.13
	11*	<i>L. montana</i> (plod)	11.36	8490.04	2406.55	11195.76	31.01	80.81	4.97	24.71
Rtanj	12*	<i>P. longifolium</i> (list)	3.52	5891.94	1314.96	7010.00	42.71	24.40	1.80	12.16
	13*	<i>P. longifolium</i> (cvet)	8.83	11024.64	2051.94	3467.90	31.41	39.81	4.93	20.43
Stara Planina	14*	<i>P. officinale</i>	0.45	8183.45	1322.72	11106.39	21.88	59.18	4.10	11.78
	15*	<i>I. graveolens</i> (list)	27.00	12333.56	1370.80	11672.56	50.85	132.76	2.49	12.26
	16*	<i>I. graveolens</i> (cvet)	9.32	9877.44	1328.02	7502.33	42.86	63.62	5.00	14.44

Relativna standardna devijacija (RSD) ispitanih metala data je u tabelama sekvencionalne BCR analize (Tabele 2 i 3).

akumulaciju metala (*P. officinale*/*I. graveolens*) i g) da li biljne vrste različitih familija i različitog geografskog položaja imaju sličnu/različitu akumulaciju metala (Lamiaceae/Apiaceae/Asteraceae).

Na osnovu sadržaja metala u biljnim vrstama (Tabela 6), možemo uočiti visok sadržaj Cu i Zn u biljnoj vrsti *L. montana* (Vidlič) u odnosu na biljke ostalih lokaliteta. Sa druge strane sadržaj Mn u ovoj biljci nije najviši, što nam govori da je akumulacija metala uslovljena i genetskom predispozicijom biljke. Određena istraživanja su pokazala da se sadržaj natrijuma u biljci kreće u intervalu od 4.11 ppm do 39498 ppm sa prosečnom koncentracijom u listu od 300 ppm (Watanabe et al., 2007). Pojedine studije su povezale ove rezultate sa prosečnim sadržajem natrijuma u ljudskom organizmu (2000 ppm) u cilju nutritivne primene ispitanih biljaka (Salter et al., 2012). Sadržaj natrijuma u ispitanim biljkama je bio u intervalu od 0.45 ppm do 27.13 ppm (Tabela 6). Najviši sadržaj natrijuma zabeležen je kod biljne vrste *S. kitaibelii* a najniži kod *P. officinale*. Poređenjem naših rezultata sa sadržajem natrijuma u nekim lekovitim biljkama (Subramanian et al., 2012) uočen je znatno niži sadržaj ovog elementa. Na osnovu prikazanih rezultata (Tabela 6), uočavamo nizak sadržaj natrijuma u biljnim vrstama *T. glabrescens*, *N. nuda*, *P. longifolium* (list) i *P. officinale* (Watanabe et al., 2007; Salter et al., 2012).

Pojedina istraživanja su pokazala da se sadržaj kalijuma u biljci kreće u intervalu od 1080 ppm do 114234 ppm sa prosečnom koncentracijom u listu od 11500 ppm (Watanabe et al., 2007). Jedan broj studija je komparirao ove rezultate sa prosečnim sadržajem kalijuma u organizmu (2900 ppm), u cilju nutritivne primene ispitanih biljaka (Salter et al., 2012). Na osnovu naših istraživanja (Tabela 6), najviši sadržaj kalijuma uočen je u listu biljne vrste *I. graveolens* (12333.56 ppm), dok je minimalni sadržaj kalijuma uočen kod *S. kitaibelii* (4663.23 ppm). Pojedine lekovite biljke odlikuju se sličnim sadržajem ovog elementa (Soares Leal et al., 2013), sa koncentracijom kalijuma u intervalu od 3949 ppm do 17850 ppm. Sadržaj kalijuma u ispitanim biljkama nalazi se u propisanim granicama (Watanabe et al., 2007; Salter et al., 2012).

Najviši sadržaj magnezijuma (Tabela 6), uočen je u nadzemnom delu biljne vrste *T. pulegioides* (3609.30 ppm), dok je minimalni sadržaj magnezijuma zabeležen kod *N. nuda* (1311.44 ppm), na istom staništu. Pojedine lekovite biljke odlikuju se sličnim sadržajem ovog elementa (Soares Leal et al., 2013), sa koncentracijom magnezijuma u intervalu od 616 ppm do 5287 ppm. Sadržaj magnezijuma u ispitanim biljkama nalazi se u propisanim granicama (Watanabe et al., 2007; Salter et al., 2012).

Sadržaj kalcijuma u biljci se kreće u intervalu od 668 ppm do 76420 ppm sa prosečnom koncentracijom u listu od 13000 ppm (Watanabe et al., 2007). Pojedine studije su povezale ove rezultate sa prosečnim sadržajem kalcijuma u organizmu (20000 ppm) u cilju nutritivne primene ispitanih biljaka (Salter et al., 2012). Na osnovu naših istraživanja (Tabela 6), najviši sadržaj kalcijuma uočen je u nadzemnom delu biljne vrste *S. kitaibelii* (17455.03 ppm), dok je minimalni sadržaj kalcijuma uočen u cvetu biljne vrste *P. longifolium* (3467.90 ppm). Interesantno je uočiti da biljna vrsta *S. kitaibelii* sadrži najveću količinu kalcijuma, upravo usled njegove visoke koncentracije u izmenljivoj frakciji zemljišta u Sićevačkoj klisuri (Slika 5B, C; Tabela 2). Sa druge strane izražen sadržaj ovog metala nije uočen u biljnoj vrsti *T. glabrescens* na području Kravlja, što upravo potvrđuje činjenicu da je akumulacija metala uslovljena i genetskom predispozicijom biljke. Sadržaj kalcijuma u ispitanim biljkama nalazi se u propisanim granicama (Watanabe et al., 2007; Salter et al., 2012). Određene lekovite biljke odlikuju se nešto višim sadržajem ovog elementa (Soares Leal et al., 2013), sa koncentracijom kalcijuma u intervalu od 9647 ppm do 22136 ppm.

Pojedina istraživanja su pokazala da se sadržaj mangana u biljkama kreće u intervalu od 12.6 ppm do 5687 ppm sa prosečnom koncentracijom u listu od 146.6 ppm (Watanabe et al., 2007). Pojedine studije su povezale ove rezultate sa prosečnim sadržajem mangana u organizmu (0.24 ppm) u cilju nutritivne primene ispitanih biljaka (Salter et al., 2012). Na osnovu naših istraživanja (Tabela 6), najviši sadržaj mangana uočen je u listu biljne vrste *I. graveolens* (50.85 ppm), dok je minimalni sadržaj mangana uočen u nadzemnom delu biljne vrste *T. pulegioides* (18.24 ppm). Brojna ispitivanja metala lekovitih biljaka, dala su slične rezultate (Meena et al., 2010; Kostić et al., 2011; Olowoyo et al., 2012; Soares Leal et al., 2013). Sadržaj mangana u ispitanim biljkama nalazi se u propisanim granicama (Watanabe et al., 2007; Salter et al., 2012).

Pojedina istraživanja su pokazala da se sadržaj gvožđa u biljci kreće u intervalu od 19.6 ppm do 12296 ppm sa prosečnom koncentracijom u listu od 100 ppm (Watanabe et al., 2007). Određeni broj studija je povezoao ove rezultate sa prosečnim sadržajem gvožđa u organizmu (86 ppm) u cilju nutritivne primene ispitanih biljaka (Salter et al., 2012). Na osnovu naših istraživanja (Tabela 6), najviši sadržaj gvožđa uočen je u listu biljne vrste *I. graveolens* (132.76 ppm), dok je minimalni sadržaj gvožđa uočen u listu biljne vrste *P. longifolium* (24.40 ppm). Interesantno je uočiti da je najviši sadržaj gvožđa određen u listu biljne vrste *I. graveolens* baš sa Stare planine. Biljna vrsta *P. officinale* sa istog lokaliteta nije pokazala akumulaciju ovog elementa, što još jedanput potvrđuje značaj genetskih faktora biljke na akumulaciju hemijskih elemenata. Brojna ispitivanja metala u lekovitim biljkama, dala su

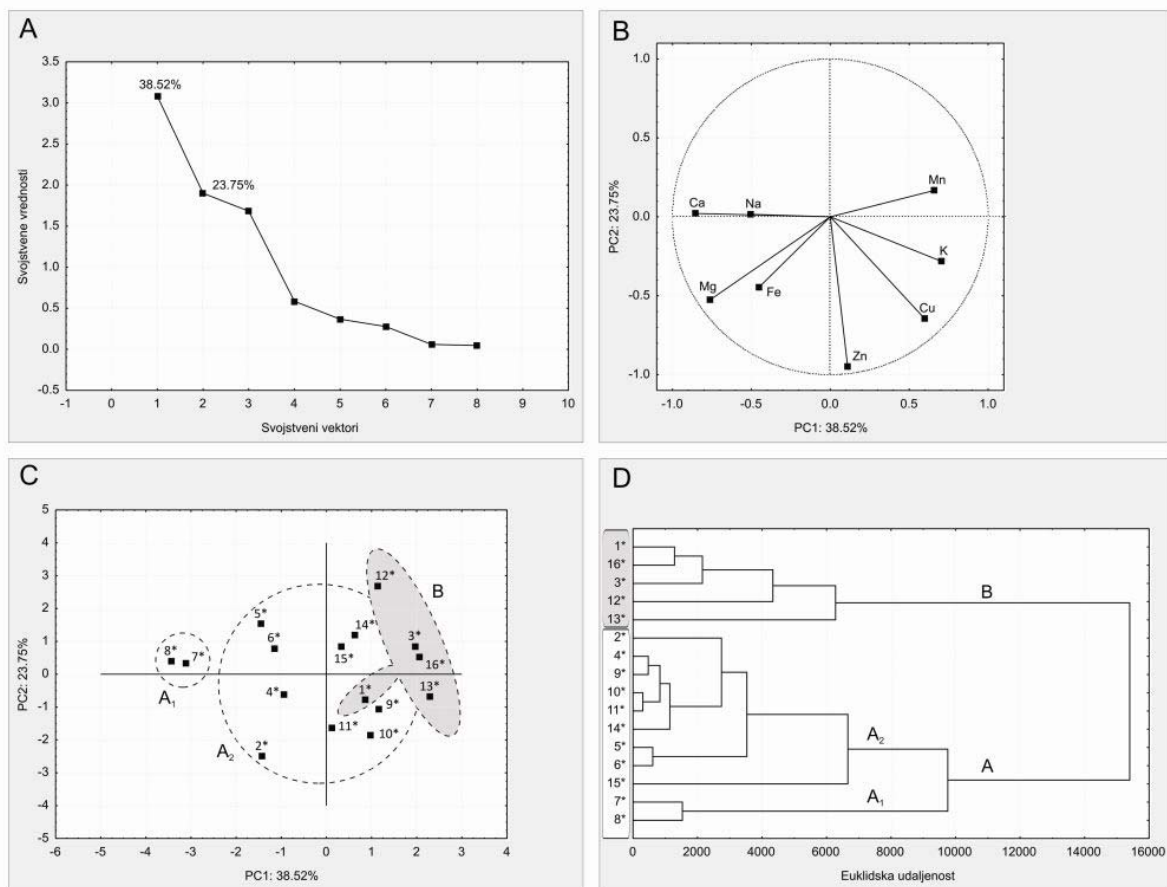
slične rezultate (Meena et al., 2010; Kostić et al., 2011; Olowoyo et al., 2012; Soares Leal et al., 2013). Sadržaj gvožđa u ispitanim biljkama nalazi se u propisanim granicama (Watanabe et al., 2007; Salter et al., 2012).

Pojedina istraživanja su pokazala da se sadržaj bakra u biljci kreće u intervalu od 16.4 ppm do 288 ppm sa prosečnom koncentracijom u listu od 43 ppm (Watanabe et al., 2007). Neke studije su povezale ove rezultate sa prosečnim sadržajem bakra u organizmu (1.5 ppm) u cilju nutritivne primene ispitanih biljaka (Salter et al., 2012). Na osnovu naših istraživanja (Tabela 6), najviši sadržaj bakra uočen je u cvetu biljne vrste *L. montana* (6.61 ppm), dok je minimalni sadržaj bakra uočen u listu biljne vrste *P. longifolium* (1.80 ppm). Brojna ispitivanja metala u lekovitim biljkama, dala su slične rezultate (Kostić et al., 2011; Olowoyo et al., 2012; Subramanian et al., 2012). Na osnovu prikazanih rezultata uočavamo nizak sadržaj bakra u ispitanim biljkama (Watanabe et al., 2007; Salter et al., 2012).

Pojedina istraživanja su pokazala da se sadržaj cinka u biljci kreće u intervalu od 2.21 ppm do 611 ppm sa prosečnom koncentracijom u listu od 20 ppm (Watanabe et al., 2007). Pojedine studije su povezale ove rezultate sa prosečnim sadržajem zinka u organizmu (47 ppm) u cilju nutritivne primene ispitanih biljaka (Salter et al., 2012). Na osnovu naših istraživanja (Tabela 6), najviši sadržaj cinka uočen je u listu biljne vrste *T. pulegioides* (25.49 ppm), dok je minimalni sadržaj cinka uočen u biljnoj vrsti *S. kitaibelii* (11.41 ppm). Brojna ispitivanja metala lekovitih biljaka, dala su slične rezultate (Kostić et al., 2011; Subramanian et al., 2012; Ebrahim et al., 2012; Soares Leal et al., 2013). Sadržaj cinka u ispitanim biljkama nalazi se u propisanim granicama (Watanabe et al., 2007; Salter et al., 2012).

4.2.1. Hemometrijska analiza sadržaja metala u ispitanim biljkama

U cilju određivanja sličnog sadržaja metala u ispitanim biljnim vrstama i uočavanja odgovornih faktora njihove akumulacije, izvršena je hemometrijska PCA i HCA analiza. Hemometrijski pristup analize sadržaja metala farmakološki značajnih biljaka je predmet pojedinih studija (Arumugam et al., 2012; Konieczynski, 2013). Usled svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa i koncentracije elemenata (Tabela 6), PC1 svojstveni vektor objasnio je 38.52% varijanse ispitanih biljaka, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 23.75% (Slika 14A). Dijagram odgovornih metala-varijabli (Slika 14B), ilustruje uticaj elemenata na klasifikaciju biljnih vrsti (Slika 14C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 15402 (Slika 14D), HCA analiza je identifikovala dve grupe biljaka (A i B). Grupa A, kojoj pripada najveći broj ispitanih biljaka, odlikovala se višim sadržajem Ca, Mg, Na, Fe i nižim sadržajem K i Mn u odnosu na biljne vrste grupe B (Slika 14B, C). Niske koncentracije Cu i Zn nisu zapaženo uticale na klasifikaciju biljaka. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti



Slika 14. Hemometrijska analiza biljnih vrsta zasnovana na njihovom sadržaju metala: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih metala; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih biljaka; (D) dendrogram HCA analize.

≥ 9761 (Slika 14D), HCA analiza je podelila grupu A na dve podgrupe (A₁ i A₂). Kraj vegetacionog perioda odlikovao je *S. kitaibelii* vrstu (podgrupa A₁), izuzetno visokim sadržajem Ca i niskim sadržajem K u odnosu na ostale biljne vrste grupe A. Pored opšte hemometrijske podele, na osnovu dendrograma (Slika 14D), možemo uočiti odgovore na neka od postavljenih pitanja u prethodnom odeljku a u vezi odgovornih faktora akumulacije metala u biljakama. Uočavamo da delovi biljne vrste *L. montana* (9*, 10* i 11*) i *P. longifolium* (12* i 13*) imaju sličan sadržaj metala, dok se list i cvet biljne vrste *I. graveolens* (15* i 16*) prilično razlikuju u sadržaju Ca, K i Fe. Na osnovu ovoga možemo zaključiti da je sadržaj metala u pojedinim delovima biljke upravo određen genetskom predispozicijom biljke. Ispitivanjem sadržaja metala vrste *S. kitaibelii* (4*, 5*, 6*, 7*, 8*) u toku vegetacione sezone uočava se izrazito smanjenje kalijuma i nagli skok kalcijuma na kraju vegetacione sezone. Ovo nam govori da pored genetske predispozicije biljne vrste, edafski uslovi sredine

(hemijski sastav i procesi u zemljištu) su drugi odlučujući faktor akumulacije metala. Poređenjem istih biljnih rodova u okviru različitih staništa $\{T. glabrescens/T. pulegioides (1^*/2^*) \text{ i } P. longifolium/P.officinale (12^*/14^*)\}$ možemo uočiti još izraženiju razliku u sadržaju metala biljnih vrsta kao posledicu združenog dejstva prethodna dva faktora (grupa A i B, Slika 14D). Ispitivanjem hemijskih elemenata biljnih vrsta $T. pulegioides$ i $N. nuda (2^* \text{ i } 3^*)$, uočavamo da biljke iste familije i istog staništa imaju različitu akumulaciju metala usled drugačije genetske predispozicije biljne vrste (grupa A i B, Slika 14D). Poređenjem biljnih vrsta istih familija a različitih ekosistema $\{T. glabrescens/T. pulegioides (1^*/2^*), N. nuda/S. kitaibelii (3^*/4^*), P. longifolium/P. officinale (12^*/14^*), L. montana/P.longifolium (9^*/12^*)\}$, uočava se još izraženija razliku u sastavu metala biljaka usled združenog dejstva različite genetike biljaka i sadržaja metala u zemljištu (grupa A i B, Slika 14D). Biljne vrste različitih familija a istog ekosistema $\{P. officinale/I. graveolens (14^*/16^*)\}$ imaju različitu akumulaciju metala usled različitih genetskih faktora (grupa A i B, Slika 14D). Biljne vrste različitih familija a različitog ekosistema (Lamiaceae/Apiaceae/Asteraceae) mogu imati sličan ili različit sadržaj metala usled kombinovane interakcije genetike biljaka i mineralnog sastava zemljišta. Na osnovu svega izloženog možemo zaključiti da genetska predispozicija biljaka i edafski uslovi sredine (hemijski sastav i procesi u zemljištu) su nerazdvojivi i neraskidivi faktori koje treba istovremeno proučavati u cilju adekvatnog razumevanja sadržaja metala u biljnim vrstama.

4.3. Hemometrijska analiza koeficijenata izmene elemenata (TC)

Koeficijent izmene elemenata (TC), detaljno je opisan u studiji Márquez-García & Córdoba (2010) a jednačina njegovog proračuna data je izrazom:

$$TC = \frac{C_{x_{biljka}}}{C_{x_{zemljište}}}$$

gde je:

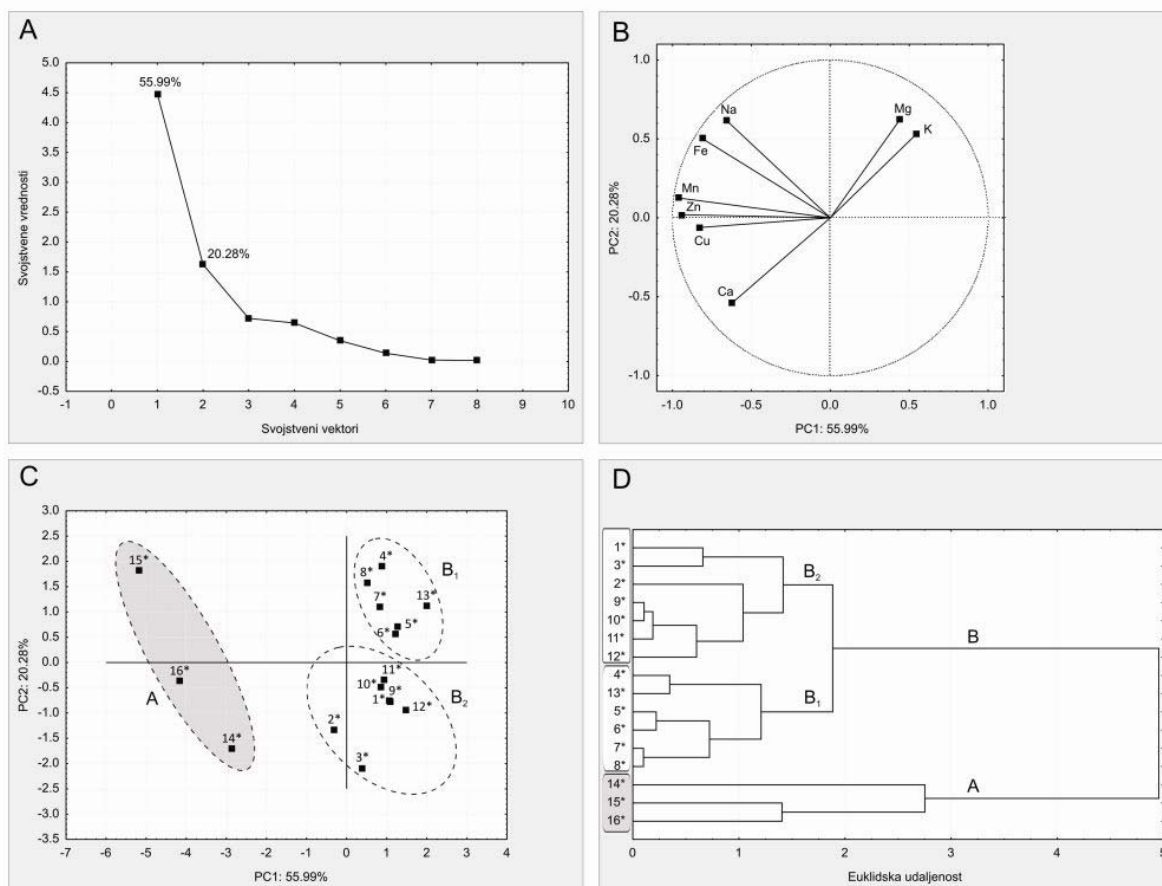
$C_{x_{biljka}}$ - koncentracija ispitanog elementa u biljci

$C_{x_{zemljište}}$ - ukupna koncentracija ispitanog elementa u zemljištu

U cilju određivanja akumulacije pojedinih elemenata u biljci ($TC > 1$) i boljeg sagledavanja složenih odnosa između sadržaja metala u zemljištu i biljnim vrstama, izračunati su koeficijenti izmene (Tabela 7). Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na TC koeficijente u cilju određivanja biljnih vrsta sa sličnom akumulacijom pojedinih elemenata. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 55.99% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 20.28% (Slika 15A). Slika 15B,

Tabela 7. Koeficijenti izmene elemenata (TC) ispitanih biljnih vrsta.

Zemljište	Br.	Biljka	Na	K	Mg	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
Kravlje	1*	<i>T. glabrescens</i>	0.0015	1.4313	0.5028	0.0877	0.0231	0.0065	0.2582	0.5201
Suva	2*	<i>T. pulegioides</i>	0.0027	1.0671	1.4675	0.9402	0.0142	0.0084	0.3203	0.9815
Planina	3*	<i>N. nuda</i>	0.0007	1.1838	0.5332	0.6816	0.0269	0.0027	0.3712	0.6102
	4*	<i>S. kitaibelii</i> (12.5.2011. god.)	0.0199	2.0929	1.7639	0.0692	0.0256	0.0131	0.6068	0.7671
Sićevačka	5*	<i>S. kitaibelii</i> (17.7.2011. god.)	0.0207	1.4667	1.7095	0.0760	0.0218	0.0056	0.4483	0.4819
klisura	6*	<i>S. kitaibelii</i> (14.8.2011. god.)	0.0086	1.4364	1.8365	0.0797	0.0269	0.0062	0.4764	0.6575
	7*	<i>S. kitaibelii</i> (28.9.2011. god.)	0.0166	1.1569	2.3278	0.1132	0.0269	0.0105	0.3888	0.6794
	8*	<i>S. kitaibelii</i> (02.11.2011. god.)	0.0377	1.1759	2.2478	0.1033	0.0266	0.0117	0.4129	0.6321
	9*	<i>L. montana</i> (list)	0.0078	1.1886	1.4997	0.4768	0.0348	0.0028	0.3538	0.4098
Vidlič	10*	<i>L. montana</i> (cvet)	0.0133	1.2782	1.4799	0.4997	0.0351	0.0048	0.3880	0.4425
	11*	<i>L. montana</i> (plod)	0.0139	1.2595	1.6410	0.5062	0.0297	0.0052	0.2913	0.4531
	12*	<i>P. longifolium</i> (list)	0.0028	1.1790	1.1342	0.2740	0.0520	0.0025	0.1722	0.2831
Rtanj	13*	<i>P. longifolium</i> (cvet)	0.0070	2.2061	1.7699	0.1355	0.0383	0.0041	0.4714	0.4758
	14*	<i>P. officinale</i>	0.0016	0.7528	0.9038	0.7762	1.9834	0.0124	1.8262	1.3943
Stara	15*	<i>I. graveolens</i> (list)	0.0934	1.1345	0.9366	0.8158	4.6102	0.0277	1.1081	1.4511
Planina	16*	<i>I. graveolens</i> (cvet)	0.0322	0.9086	0.9074	0.5243	3.8857	0.0133	2.2240	1.7092



Slika 15. Hemometrijska analiza biljnih vrsta zasnovana na TC koeficijentu izmene: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih koeficijenata; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih biljaka; (D) dendrogram HCA analize.

ilustruje uticaj TC metala, na klasifikaciju biljnih vrsta (Slika 15C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 4.96 (Slika 15D), HCA analiza je podelila biljke na dve grupe (A i B). Grupa A, biljne vrste sa područja Stare Planine (*P. officinale* (14*) i *I. graveolens* (15* i 16*)), pokazale su značajnu akumulaciju Mn, Cu i Zn u odnosu na ostale biljne vrste (Slika 15B, C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.86 (Slika 15D), HCA analiza je podelila grupu B na dve podgrupe (B₁ i B₂). Biljne vrste podgrupe B₁, *S. kitaibelii* (4*-8*) i *P. longifolium* (13*), odlikovale su se izraženom akumulacijom Mg i K (Slika 15B, C). Akumulacija Mg i K uočena je i u ostalim biljnim vrstama grupe B ali u nešto manje izraženom obliku. Na osnovu TC vrednosti možemo konstantovati da ni jedna biljna vrsta nije akumulator natrijuma, kalcijuma i gvožđa.

4.4. Hemometrijska analiza biokoncentracionog faktora elemenata (BF)

Biokoncentracioni faktor elemenata (BF), detaljno je opisan u studiji Márquez-García & Córdoba (2010) a jednačina njegovog proračuna data je izrazom:

$$BF = \frac{C_{x_{\text{biljka}}}}{C_{x_{\text{biodostupna frakcija zemljišta}}}}$$

gde je:

$C_{x_{\text{biljka}}}$ - koncentracija ispitanog elementa u biljci

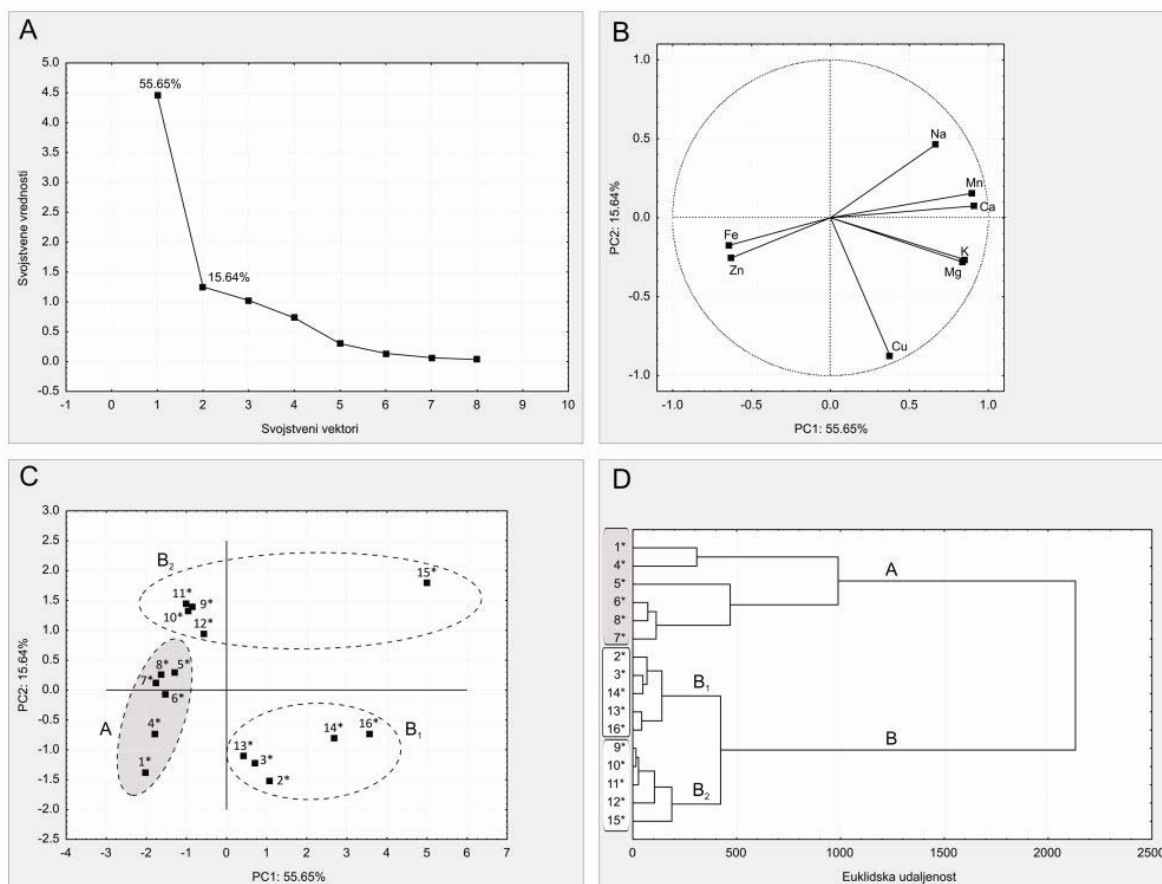
$C_{x_{\text{biodostupna frakcija zemljišta}}}$ - koncentracija ispitanog elementa u karbonatnoj frakciji zemljišta

U cilju određivanja tolerantnosti biljaka ($BF > 1$) na toksičan efekat elemenata biodostupne frakcije zemljišta (karbonatna frakcija) i boljeg sagledavanja složenih odnosa između sadržaja metala u zemljištu i biljnim vrstama, izračunat je biokoncentracioni faktor (Tabela 8). Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na BF faktore u cilju određivanja biljnih vrsta sa sličnom tolerantnošću na metale. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacione matrice, PC1 svojstveni vektor objasnio je 55.65% ukupne varijanse, dok je PC2 vektor opisao ostalih 15.64% (Slika 16A). Slika 16B, ilustruje uticaj BF faktora, na klasifikaciju biljnih vrsta (Slika 16C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2130 (Slika 16D), HCA analiza je podelila biljke na dve grupe (A i B). Grupa A, biljne vrste sa područja Kravlja i Sićevačke klisure $\{T. glabrescens (1^*) \text{ i } S. kitaibelii (4^*-8^*)\}$, pokazale su značajnu tolerantnost na Fe i Zn u odnosu na ostale biljne vrste (Slika 16B, C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 423 (Slika 16D), HCA analiza je podelila grupu B na dve podgrupe (B_1 i B_2). Biljne vrste podgrupe B_1 $\{T. pulegioides (2^*), N. nuda (3^*), P. longifolium (13^*), P. officinale (14^*) \text{ i } I. graveolens (16^*)\}$ odlikovale su se izraženom tolerancijom na K, Mg i Cu (Slika 16B, C). Bitno je naglasiti da su sve biljne vrste u većoj ili manjoj meri tolerantne na prethodno navedene metale (Tabela 8). Visoke koncentracije Na, Ca i Mn karbonatne frakcije uticale su na smanjenu tolerantnost biljaka ($BF < 1$), što se može manifestovati njihovom toksičnošću (Kabata-Pendias, 2010; Borer et al., 2012; Hasegawa 2013). Biljne vrste podgrupe B_2 pokazale su jedan vid tolerancije u odnosu na ispitane metale. I pored niže tolerancije biljaka na Na, Ca i Mn, treba naglasiti da štetan uticaj ovih metala nije uočen prilikom njihovog sakupljanja i determinacije.

Na osnovu kompletne hemijske, mineraloške i hemometrijske analize zemljišta i odabranih biljnih vrsta možemo uočiti: a) sadržaj analiziranih metala u biljnim vrstama je uslovljen kombinovanim uticajem genetskih faktora i mineraloških/hemijskih karakteristika zemljišta, b) ispitani elementi biljnih vrsta se nalaze u okviru graničnih koncentracija lekovitog bilja, c) sadržaj određivanih metala u analiziranim zemljištima se nalazi u okviru njihovih uobičajenih koncentracija u Zemljinoj kori, d) snažan uticaj karbonatne frakcije na biodostupnost analiziranih metala zemljišta, e) obogaćenje zemljišta pojedinim elementima i identifikaciju

Tabela 8. Biokoncentracioni faktor elemenata (BF) ispitanih biljnih vrsta.

Zemljište	Br.	Biljka	Na	K	Mg	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
Kravlje	1*	<i>T. glabrescens</i>	0.17	31.38	3.64	0.11	0.10	42.52	415.89	2116.83
Suva	2*	<i>T. pulegioides</i>	0.62	105.87	16.17	2.56	0.07	40.76	367.10	43.20
Planina	3*	<i>N. nuda</i>	0.15	117.45	5.87	1.86	0.14	12.90	425.37	26.86
Sićevačka klisura	4*	<i>S. kitaibelii</i> (12.5.2011. god.)	0.56	29.87	3.88	0.14	0.08	37.84	351.55	1815.65
	5*	<i>S. kitaibelii</i> (17.7.2011. god.)	0.59	20.93	3.76	0.15	0.07	16.16	259.70	1140.72
	6*	<i>S. kitaibelii</i> (14.8.2011. god.)	0.24	20.50	4.04	0.16	0.09	17.81	276.00	1556.35
	7*	<i>S. kitaibelii</i> (28.9.2011. god.)	0.47	16.51	5.12	0.22	0.09	30.14	225.25	1608.06
	8*	<i>S. kitaibelii</i> (02.11.2011. god.)	1.07	16.78	4.94	0.20	0.09	33.64	239.19	1496.28
Vidlič	9*	<i>L. montana</i> (list)	0.52	34.42	4.32	1.01	0.12	16.47	100.51	10.20
	10*	<i>L. montana</i> (cvet)	0.89	37.01	4.26	1.06	0.12	28.26	110.24	11.02
Rtanj	11*	<i>L. montana</i> (plod)	0.93	36.47	4.72	1.07	0.10	31.08	82.78	11.28
	12*	<i>P. longifolium</i> (list)	0.28	31.33	5.10	0.51	0.16	5.05	180.03	39.21
Stara Planina	13*	<i>P. longifolium</i> (cvet)	0.70	58.63	7.96	0.25	0.12	8.24	492.75	65.89
	14*	<i>P. officinale</i>	0.08	75.16	12.73	13.38	4.76	2.22	410.39	34.65
	15*	<i>I. graveolens</i> (list)	4.83	113.28	13.19	14.06	11.05	4.99	249.01	36.06
	16*	<i>I. graveolens</i> (cvet)	1.67	90.72	12.78	9.04	9.32	2.39	499.78	42.48



Slika 16. Hemometrijska analiza biljnih vrsta zasnovana na BF faktoru: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih BF faktora metala; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih biljaka; (D) dendrogram HCA analize.

odgovornih minerala XRD analizom, f) korelaciju pojedinih hemijskih parametara zemljišta (pH, Eh, CEC, EC, organska materija), g) dostupnost redukovanih oblika elemenata biljci (Eh-pH dijagrami), h) akumulaciju metala u pojedinim biljnim vrstama i i) tolerantnost pojedinih biljaka prema metalima. Analiza sadržaja metala u biljnom materijalu i kompletna geochemijska analiza zemljišta je potvrda da ispitane biljne vrste mogu biti značajne za ljudsku ishranu kao izvor neophodnih elemenata važnih za optimalno funkcionisanje ljudskog organizma na biochemijskom nivou.

4.5. Etarska ulja

4.5.1. Hemijski sastav etarskog ulja *T. pulegioides*

Hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *T. pulegioides*, prinos etarskog ulja iznosio je 0.87%, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (European Pharmacopoeia, 2008). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja, identifikovano je 38 komponenata, koje predstavljaju 97.29% ukupno detektovanih supstanci (Tabela 9). Komponente etarskog ulja

Tabela 9. Hemijski sastav etarskog ulja *T. pulegioides*.

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>T. pulegioides</i> (%)
Monoterpenski ugljovodonici				0.64
α -Pinen	8.395	932.0	932.0	0.05
Kamfen	8.949	946.0	948.3	0.12
Mircen	10.314	988.0	988.8	0.22
Limonen	11.727	1024.0	1028.6	0.03
β - <i>cis</i> -Ocimen	11.977	1032.0	1035.5	0.08
β - <i>trans</i> -Ocimen	12.356	1044.0	1045.9	0.11
γ -Terpinen	12.775	1054.0	1057.5	0.03
Oksidovani monoterpeni				84.51
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	13.241	1065.0	1070.3	0.07
<i>trans</i> -Linalool oksid	13.830	1084.0	1086.5	0.05
Linalool	14.349	1095.0	1100.7	1.91
Kamfor	16.039	1141.0	1147.6	0.15
Borneol	16.955	1165.0	1173.0	0.58
Nerol	18.872	1227.0	1227.1	5.18
Neral	19.277	1235.0	1238.8	0.56
Geraniol	20.102	1249.0	1262.6	66.59
Geranial	20.469	1264.0	1273.1	0.80
Bornil acetat	20.965	1287.0	1287.4	0.04
Neril acetat	23.356	1359.0	1359.0	0.11
Geranil acetat	24.105	1379.0	1381.6	8.47
Seskviterpenski ugljovodonici				9.60
δ -Elemen	22.483	1335.0	1332.6	0.06
β -Burbonen	24.198	1387.0	1384.4	0.41
β -Kariofilen	25.387	1417.0	1421.4	3.62
α - <i>trans</i> -Bergamoten	25.754	1432.0	1433.1	0.03
β - <i>trans</i> -Farnezen	26.371	1454.0	1452.7	0.05
α -Humulen	26.477	1452.0	1456.1	0.21
Alloaromadendren	26.605	1458.0	1460.2	0.07
Germakren D	27.277	1484.0	1481.6	1.20
Biciklogermakren	27.710	1500.0	1495.4	0.32
β -Bisabolen	28.120	1505.0	1508.9	3.45
δ -Kadinen	28.391	1522.0	1518.1	0.11
β -Seskvifelandren	28.559	1521.0	1523.7	0.07
Oksidovani seskviterpeni				0.93
Spatulenol	30.137	1577.0	1576.9	0.14
Kariofilen oksid	30.304	1582.0	1582.5	0.66
α -Kadinol	32.386	1652.0	1655.4	0.13
Fenolna jedinjenja				0.21
Timol	21.163	1289.0	1293.1	0.10
Karvakrol	21.436	1298.0	1301.0	0.11

Tabela 9. (nastavak...)

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>T. pulegioides</i> (%)
Ostala jedinjenja				1.40
1-Okten-3-ol	10.000	974.0	979.6	0.39
3-Oktan-3-ol	10.610	988.0	997.6	1.01
Ukupno				97.29

^{a)} RT = Retenciono vreme; ^{b)} AIL = Aritmetički (retencioni) indeks – literaturni podaci; ^{c)} AIE = Aritmetički (retencioni) indeks eksperimentalno određen na HP-5MS koloni.

T. pulegioides možemo podeliti na šest grupa: 1) monoterpeni ugljovodoni, 2) oksidovani monoterpeni, 3) seskviterpeni ugljovodoni, 4) oksidovani seskviterpeni, 5) fenolna jedinjenja i 6) ostala jedinjenja. Oksidovani monoterpeni predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja etarskog ulja *T. pulegioides* (84.51%), sa dominantnim sadržajem geraniola (66.59%), geranil acetata (8.47%) i nerola (5.18%). Seskviterpeni ugljovodoni (9.60%), odlikovali su se višim sadržajem β -kariofilena (3.62%) i β -bisabolena (3.45%). Etarsko ulje *T. pulegioides* iz Srbije pripada hemotipu geraniol/geranil acetat (Sárosi et al., 2012). Hemijski polimorfizam etarskih ulja jeste bitna karakteristika roda *Thymus*. Poznato je da pored genetske predispozicije biljne vrste i sami uslovi sredine mogu uticati na različiti hemijski sastav etarskog ulja. Pokazano je da su fenolna jedinjenja karakteristika ulja biljaka koje rastu u toplim i suvim klimatskim zonama, dok je sadržaj fenolnih jedinjenja znatno niži kod biljaka u hladnim i kišnim područjima (Ložiené et al., 2008). U Mađarskoj, opisano je šest hemotipova etarskog ulja *T. pulegioides*: karvakrol/timol, karvakrol/timol/metiletar/ γ -terpinen, geranil/linalil-acetat/neral/linalool, p-cimen/spatulenol/geraniol, β -kariofilen/timol/germakren D, germakren D/ β -kariofilen/ α,β -farnezen/spatulenol (Pluhár et al., 2012). Ovakva hemijska različitost etarskih ulja iste biljne vrste, svakako će doprineti njihovoj drugačijoj biološkoj aktivnosti.

4.5.2. Hemijski sastav etarskog ulja *T. glabrescens*

Hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *T. glabrescens*, prinos etarskog ulja iznosio je 0.59%, što je u saglasnosti sa podacima farmakopeje (European Pharmacopoeia, 2008). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja, identifikovano je 56 komponenta, koje predstavljaju 97.76% ukupno detektovanih supstanci (Tabela 10). Komponente etarskog ulja *T. glabrescens*, slično ulju *T. pulegioides*, možemo podeliti na šest grupa: 1) monoterpeni ugljovodoni, 2) oksidovani monoterpeni, 3) seskviterpeni ugljovodoni, 4) oksidovani seskviterpeni, 5) fenolna jedinjenja i 6) ostala jedinjenja. Oksidovani monoterpeni predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja etarskog ulja *T. glabrescens* (57.14%), sa dominantnim sadržajem geraniola (22.33%), geranil acetata (19.38%) i linaloola (5.49%).

Tabela 10. Hemijski sastav etarskog ulja *T. glabrescens*.

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>T. glabrescens</i> (%)
Monoterpeni ugljovodoni				11.07
α -Tujen	8.161	924.0	925.0	0.33
α -Pinen	8.400	932.0	932.1	0.29
Kamfen	8.951	946.0	948.4	0.15
Sabinen	9.734	969.0	971.6	0.09
β -Pinen	9.897	974.0	976.5	0.10
Mircen	10.320	988.0	989.0	0.59
α -Felandren	10.909	1002.0	1006.1	0.10
3-Karen	10.984	1008.0	1007.9	0.03
α -Terpinen	11.294	1014.0	1016.6	0.60
p-Cimen	11.620	1020.0	1025.6	4.73
Limonen	11.751	1024.0	1029.2	0.81
β - <i>cis</i> -Ocimen	11.980	1032.0	1035.6	0.15
β - <i>trans</i> -Ocimen	12.362	1044.0	1046.1	0.18
γ -Terpinen	12.822	1054.0	1058.7	2.75
Terpinolen	13.767	1086.0	1084.8	0.17
Oksidovani monoterpeni				57.14
Eukaliptol	11.861	1026.0	1032.3	0.56
<i>trans</i> -Linalool oksid	13.828	1084.0	1086.5	0.03
Linalool	14.437	1095.0	1103.2	5.49
α -Tujon	14.603	1101.0	1107.8	0.38
<i>cis</i> -p-Menta-2,8-dienol	15.697	1133.0	1138.4	0.01
Borneol	16.956	1165.0	1173.0	0.47
4-Terpineol	17.249	1174.0	1181.1	0.47
α -Terpineol	17.790	1186.0	1196.1	0.79
<i>trans</i> -Dihidrokarvon	18.088	1200.0	1204.5	0.02
Nerol	18.842	1227.0	1226.3	1.18
Izobornil formijat	18.990	1235.0	1230.5	2.87
Neral	19.311	1235.0	1239.8	2.25
Geraniol	19.936	1249.0	1257.8	22.33
Geranial	20.396	1264.0	1271.0	0.50
Bornil acetat	20.924	1287.0	1286.3	0.20
Neril acetat	23.364	1359.0	1359.2	0.21
Geranil acetat	24.244	1379.0	1385.8	19.38
Seskviterpeni ugljovodoni				14.56
α -Kubeben	23.065	1345.0	1350.2	5.51
α -Kopaen	23.927	1374.0	1376.2	0.03
β -Elemen	24.409	1389.0	1390.7	0.09
β -Kariofilen	25.384	1417.0	1421.3	1.04
α - <i>trans</i> -Bergamoten	25.770	1432.0	1433.6	0.05
Aromadendren	25.952	1439.0	1439.4	0.12
β - <i>trans</i> -Farnezen	26.376	1454.0	1452.9	0.22
α -Humulen	26.487	1452.0	1456.4	0.13

Tabela 10. (nastavak...)

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>T. glabrescens</i> (%)
γ-Muurolen	27.083	1478.0	1475.4	0.16
Germakren D	27.302	1484.0	1482.4	1.57
β-Selinen	27.567	1489.0	1490.8	0.14
Biciklogermakren	27.734	1500.0	1496.2	1.01
β-Bisabolen	28.153	1505.0	1510.0	4.08
γ-Kadinen	28.258	1513.0	1513.6	0.11
δ-Kadinen	28.410	1522.0	1518.7	0.21
β-Seskvifelandren	28.563	1521.0	1523.9	0.09
Oksidovani seskviterpeni				0.37
Spatulenol	30.140	1577.0	1577.0	0.29
Kariofilen oksid	30.300	1582.0	1582.3	0.08
Fenolna jedinjenja				14.00
Timol	21.350	1289.0	1298.6	13.79
Karvakrol	21.499	1298.0	1303.0	0.19
Eugenol	23.155	1356.0	1352.9	0.02
Ostala jedinjenja				0.62
<i>trans</i> -2-Heksenal	5.987	846.0	850.2	0.03
1-Okten-3-ol	10.010	974.0	979.8	0.45
3-Oktanol	10.596	988.0	997.2	0.14
Ukupno				97.76

^{a)} RT = Retenciono vreme; ^{b)} AIL = Aritmetički (retencioni) indeks – literaturni podaci; ^{c)} AIE = Aritmetički (retencioni) indeks eksperimentalno određen na HP-5MS koloni.

Seskviterpenski ugljovodonic (14.56%), odlikovali su se višim sadržajem α-kubebena (5.51%) i β-bisabolena (4.08%). Za razliku od ulja *T. pulegioides*, sadržaj fenolnih jedinjenja i procenat timola (13.79%) u ispitanom ulju je znatno viši. Etarsko ulje *T. glabrescens* iz jugoistočne Srbije pripada hemotipu geraniol/geranil acetat/timol (Simkó et al., 2013). Kao što je već naglašeno, hemijski polimorfizam etarskih ulja roda *Thymus* je vrlo izražen.

4.5.3. Hemijski sastav etarskog ulja *S. kitaibelii*

Hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *S. kitaibelii*, prinos etarskog ulja iznosio je 0.55%, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Slavkowska et al., 2001). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja, identifikovano je 52 komponente, koje predstavljaju 97.65% ukupno detektovanih supstanci (Tabela 11). U cilju hemometrijske analize ulja na osnovu hemijskog sastava, komponente *S. kitaibelii* ulja možemo podeliti na šest grupa: 1) monoterpenski ugljovodonic, 2) oksidovani monoterpeni, 3) seskviterpenski ugljovodonic, 4) oksidovani seskviterpeni, 5) fenolna jedinjenja i 6) ostala jedinjenja. Oksidovani monoterpeni predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja etarskog ulja *S. kitaibelii* (59.76%), sa dominantnim sadržajem geraniola (50.43%). Seskviterpenski ugljovodonic (26.61%), odlikovali su se visokim sadržajem germakrena D (12.22%) i β-kariofilena (6.52%).

Tabela 11. Hemijski sastav etarskog ulja *S. kitaibelii*.

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>S. kitaibelii</i> (%)
Monoterpenski ugljovodonici				9.31
α -Tujen	8.157	924.0	924.9	0.02
α -Pinen	8.398	932.0	932.0	0.26
Kamfen	8.950	946.0	948.4	0.06
Sabinen	9.731	969.0	971.5	0.03
β -Pinen	9.895	974.0	976.4	0.03
Mircen	10.315	988.0	988.9	0.38
α -Felandren	10.904	1002.0	1005.9	0.08
α -Terpinen	11.284	1014.0	1016.4	0.14
p-Cimen	11.567	1020.0	1024.2	0.19
Limonen	11.756	1024.0	1029.4	2.75
β - <i>cis</i> -Ocimen	12.008	1032.0	1036.3	2.56
β - <i>trans</i> -Ocimen	12.378	1044.0	1046.5	1.61
γ -Terpinen	12.792	1054.0	1057.9	0.88
Terpinolen	13.759	1086.0	1084.5	0.06
p-Cimenen	14.001	1089.0	1091.2	0.03
Allocimen	15.318	1128.0	1127.7	0.23
Oksidovani monoterpeni				59.76
Eukaliptol	11.852	1026.0	1032.0	0.11
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	13.246	1065.0	1070.4	0.64
Linalool	14.359	1095.0	1101.1	1.99
Borneol	16.955	1165.0	1173.0	0.52
4-Terpineol	17.249	1174.0	1181.1	0.71
α -Terpineol	17.771	1186.0	1195.6	0.13
Nerol	18.848	1227.0	1226.4	2.60
Neral	19.293	1235.0	1239.3	1.05
Geraniol	19.939	1249.0	1257.9	50.43
Geranial	20.482	1264.0	1273.5	1.47
Geranil acetat	24.004	1379.0	1378.5	0.11
Seskviterpenski ugljovodonici				26.61
δ -Elemen	22.487	1335.0	1332.8	0.49
α -Kubeben	22.972	1345.0	1347.4	0.03
α -Kopaen	23.926	1374.0	1376.2	0.43
β -Burbonen	24.197	1387.0	1384.4	0.77
β -Elemen	24.377	1389.0	1389.9	0.87
β -Kariofilen	25.420	1417.0	1422.4	6.52
β - <i>trans</i> -Farnezen	26.325	1454.0	1451.3	0.10
α -Humulen	26.474	1452.0	1456.0	0.24
Alloaromadendren	26.606	1458.0	1460.2	0.06
γ -Muurolen	27.131	1478.0	1477.0	0.16
Germakren D	27.393	1484.0	1485.3	12.22
β -Selinen	27.563	1489.0	1490.7	0.07
Biciklogermakren	27.767	1500.0	1497.2	2.99

Tabela 11. (nastavak...)

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>S. kitaibellii</i> (%)
β-Bisabolen	28.095	1505.0	1508.1	1.20
γ-Kadinen	28.241	1513.0	1513.0	0.09
δ-Kadinen	28.393	1522.0	1518.1	0.37
Oksidovani seskviterpeni				0.95
Spatulenol	30.145	1577.0	1577.1	0.49
Kariofilen oksid	30.305	1582.0	1582.5	0.26
α-Kadinol	32.384	1652.0	1655.3	0.20
Fenolna jedinjenja				0.59
Timol	21.160	1289.0	1293.1	0.54
Karvakrol	21.422	1298.0	1300.6	0.05
Ostala jedinjenja				0.43
<i>trans</i> -2-Heksenal	5.983	846.0	850.0	0.04
1-Okten-3-ol	9.998	974.0	979.4	0.30
6-Metil-5-hepten-2-on	10.144	981.0	983.8	0.05
3-Oktanol	10.589	988.0	997.0	0.04
Ukupno				97.65

^{a)} RT = Retenciono vreme; ^{b)} AIL = Aritmetički (retencioni) indeks – literaturni podaci;

^{c)} AIE = Aritmetički (retencioni) indeks eksperimentalno određen na HP-5MS koloni.

Poznato je da pored genetske predispozicije biljne vrste i sami uslovi sredine mogu uticati na različiti hemijski sastav etarskog ulja roda *Satureja* (Lakušić et al., 2011). Glavna komponente etarskog ulja *S. kitaibellii* sa područja istočne Srbije je p-cimen (Chalchat et al., 1999; Kundaković et al., 2011). Dominantan sadržaj limonena uočen je u studiji Mihajilov-Krstev et al. (2011), dok su istraživanja (Palić & Gašić, 1993; Miladinović, 2005) upućivala na visok sadržaj geraniola u etarskom ulju.

4.5.4. Hemijski sastav etarskog ulja *N. nuda*

Hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *N. nuda*, prinos etarskog ulja iznosio je 0.62%, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Mancini et al., 2009; Gkinis et al., 2010). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja, identifikovano je 57 komponenata, koje predstavljaju 92.63% ukupno detektovanih supstanci (Tabela 12). U cilju hemometrijske analize ulja na osnovu hemijskog sastava, komponente *N. nuda* ulja možemo podeliti na šest grupa: 1) monoterpeni ugljovodoni, 2) oksidovani monoterpeni, 3) seskviterpeni ugljovodoni, 4) oksidovani seskviterpeni, 5) fenolna jedinjenja i 6) ostala jedinjenja. Oksidovani monoterpeni predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja etarskog ulja *N. nuda* (57.77%), sa dominantnim sadržajem eukaliptola (45.96%). U okviru ove grupe identifikovan je 4α,7α,7α-nepetalakton (4.33%) i 4α,7β,7α-nepetalakton (0.48%). Seskviterpeni ugljovodoni (20.46%), odlikovali su se dominantnim sadržajem germakrena D (6.82%).

Tabela 12. Hemijski sastav etarskog ulja *N. nuda*.

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>N. nuda</i> (%)
Monoterpenski ugljovodonic				8.62
α -Tujen	8.159	924.0	924.9	0.02
α -Pinen	8.408	932.0	932.3	1.36
Kamfen	8.954	946.0	948.5	0.03
Sabinen	9.755	969.0	972.3	1.74
β -Pinen	9.940	974.0	977.8	4.04
Mircen	10.328	988.0	989.2	0.84
α -Terpinen	11.310	1014.0	1017.3	0.10
β - <i>trans</i> -Ocimen	12.375	1044.0	1046.4	0.21
γ -Terpinen	12.795	1054.0	1057.9	0.20
Terpinolen	13.765	1086.0	1084.7	0.08
Oksidovani monoterpeni				57.77
Eukaliptol	11.873	1026.0	1026.3	45.96
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	13.250	1065.0	1070.5	0.59
α -Kamfolenal	15.285	1122.0	1126.7	0.07
Nopinon	15.710	1135.0	1138.5	0.09
<i>trans</i> -Pinokarveol	15.798	1135.0	1141.0	0.23
Citronelal	16.207	1148.0	1152.2	0.07
Sabina keton	16.396	1154.0	1157.5	0.03
α -Felandren-8-ol	16.903	1166.0	1171.6	1.38
4-Terpineol	17.244	1174.0	1180.9	0.47
α -Terpineol	17.765	1186.0	1195.4	3.44
<i>trans</i> -Dihidrokarvon	17.949	1200.0	1200.5	0.23
<i>trans</i> -Karveol	18.572	1215.0	1218.5	0.06
Nerol	18.843	1227.0	1226.3	0.05
Neral	19.251	1235.0	1238.1	0.11
Geraniol	19.658	1249.0	1250.0	0.04
Geranial	20.275	1264.0	1267.5	0.14
4 α ,7 α ,7 α -Nepetalakton	23.531	1357.0	1364.3	4.33
4 α ,7 β ,7 α -Nepetalakton	24.625	1391.0	1397.2	0.48
Seskviterpenski ugljovodonic				20.46
α -Kopaen	23.917	1374.0	1375.9	0.22
β -Burbonen	24.204	1387.0	1384.6	2.38
β -Elemen	24.363	1389.0	1389.4	0.64
α -Gurjunen	24.927	1409.0	1406.7	0.10
β -Kariofilen	25.387	1417.0	1421.4	4.76
γ -Elemen	25.653	1434.0	1429.9	0.32
β - <i>trans</i> -Farnezen	26.402	1454.0	1453.7	2.16
α -Humulen	26.479	1452.0	1456.2	1.04
Alloaromadendren	26.598	1458.0	1460.1	0.03
Germakren D	27.334	1484.0	1483.4	6.82
β -Selinen	27.604	1489.0	1492.0	0.03
Biciklogermakren	27.706	1500.0	1495.3	0.18

Tabela 12. (nastavak...)

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>N. nuda</i> (%)
α -Selinen	27.800	1498.0	1498.2	0.08
α - <i>trans</i> -Farnezen	27.959	1505.0	1503.5	0.11
β -Bisabolen	28.079	1505.0	1507.5	0.67
γ -Kadinen	28.227	1513.0	1512.5	0.04
δ -Kadinen	28.376	1522.0	1517.5	0.31
β -Seskvifelandren	28.557	1521.0	1523.6	0.57
Oksidovani seskviterpeni				5.16
Hedikariol	29.391	1546.0	1551.7	0.29
Kariofilenil alkohol	29.944	1570.0	1570.4	0.04
Spatulenol	30.170	1577.0	1578.0	0.36
Kariofilen oksid	30.352	1582.0	1584.1	3.97
Ledol	30.945	1602.0	1604.3	0.17
α -Kadinol	32.384	1652.0	1655.3	0.33
Fenolna jedinjenja				0.02
Metil salicilat	17.616	1190.0	1191.1	0.02
Ostala jedinjenja				0.60
<i>trans</i> -2-Heksenal	6.045	846.0	852.4	0.05
1-Okten-3-ol	10.149	974.0	983.9	0.47
n-Trikozan	48.047	2300.0	2299.6	0.03
n-Pentakozan	52.090	2500.0	2499.6	0.05
Ukupno				92.63

^{a)} RT = Retenciono vreme; ^{b)} AIL = Aritmetički (retencioni) indeks – literaturni podaci;

^{c)} AIE = Aritmetički (retencioni) indeks eksperimentalno određen na HP-5MS koloni.

4.5.5. Hemijski sastav etarskog ulja *L. montana*

Hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *L. montana*, prinos etarskog ulja iznosio je 0.67%. Prinos etarskog ulja je nešto viši u odnosu na prinos etarskog ulja *Seseli libanotis* iz Turske (0.35%) i Irana (0.13%) (Ozturk & Ercisli, 2006; Masoudi et al., 2006). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja, identifikovano je 50 komponentata, koje predstavljaju 93.84% ukupno detektovanih supstanci (Tabela 13). U cilju hemometrijske analize ulja na osnovu hemijskog sastava, komponente *L. montana* ulja možemo podeliti na šest grupa: 1) monoterpeni ugljovodoni, 2) oksidovani monoterpeni, 3) seskviterpeni ugljovodoni, 4) oksidovani seskviterpeni, 5) fenolna jedinjenja i 6) ostala jedinjenja. Za razliku od prethodno diskutovanih ulja, seskviterpeni ugljovodoni predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja (67.30%), sa dominantnim sadržajem β -elemena (40.43%). Oksidovani seskviterpeni (12.29%), predstavljaju drugu najzastupljeniju grupu jedinjenja, i odlikuju se dominantnim sadržajem α -bisabolola (6.60%). Za razliku od naših ispitivanja (Miladinović et al., 2014), glavne komponente etarskih ulja *S. libanotis* iz Turske i Irana su *trans*-kariofilen (20.39%) i akorenol (35.50%) (Ozturk & Ercisli, 2006; Masoudi et al., 2006).

Tabela 13. Hemijski sastav etarskog ulja *L. montana*.

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>L. montana</i> (%)
Monoterpenski ugljovodonici				10.95
α -Pinen	8.428	932.0	932.9	4.16
Kamfen	8.959	946.0	948.6	0.64
Sabinen	9.736	969.0	971.7	0.12
β -Pinen	9.943	974.0	977.8	0.92
<i>trans</i> -Izolimonen	10.214	980.0	985.9	0.05
Mircen	10.318	988.0	988.9	0.31
α -Felandren	10.929	1002.0	1006.6	2.17
p-Cimen	11.576	1020.0	1024.4	0.92
Limonen	11.748	1024.0	1029.1	1.34
β - <i>trans</i> -Ocimen	12.357	1044.0	1045.9	0.19
Terpinolen	13.765	1086.0	1084.7	0.13
Oksidovani monoterpeni				1.67
Eukaliptol	11.803	1026.0	1030.7	0.58
Linalool	14.328	1095.0	1100.2	0.62
4-Terpineol	17.246	1174.0	1181.0	0.05
α -Terpineol	17.769	1186.0	1195.5	0.13
Karvon	19.459	1239.0	1244.0	0.02
Piperiton	19.814	1249.0	1254.3	0.02
Bornil acetat	20.869	1287.0	1284.7	0.25
Seskviterpenski ugljovodonici				67.30
δ -Elemen	22.573	1335.0	1335.3	0.29
α -Kubeben	22.967	1345.0	1347.2	0.04
α -Kopaen	23.924	1374.0	1376.1	0.23
β -Elemen	24.611	1389.0	1396.8	40.43
α -Kedren	25.284	1410.0	1418.0	0.06
β -Kariofilen	25.432	1417.0	1422.8	6.46
α - <i>trans</i> -Bergamoten	25.764	1432.0	1433.3	0.02
α -Gvajen	25.835	1437.0	1435.7	0.11
Aromadendren	26.006	1439.0	1441.1	0.11
Sejšelin	26.286	1444.0	1450.0	0.22
β - <i>cis</i> -Farnezen	26.413	1440.0	1454.1	3.01
α -Humulen	26.519	1452.0	1457.5	2.56
γ -Muurolen	27.041	1478.0	1474.0	0.62
Germakren D	27.321	1484.0	1483.0	3.52
β -Selinen	27.562	1489.0	1490.7	1.97
α -Selinen	27.759	1498.0	1497.0	1.72
β - <i>trans</i> -Gvajen	27.922	1502.0	1502.3	0.44
β -Bisabolen	28.127	1505.0	1509.1	2.59
γ -Kadinen	28.251	1513.0	1513.3	0.12
δ -Kadinen	28.397	1522.0	1518.3	0.67
β -Seskvifelandren	28.565	1521.0	1523.9	0.93
Germakren B	29.631	1559.0	1559.9	1.18

Tabela 13. (nastavak...)

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>L. montana</i> (%)
Oksidovani seskviterpeni				12.29
Elemol	29.307	1548.0	1548.9	1.58
Spatulenol	30.177	1577.0	1578.2	0.88
Kariofilen oksid	30.347	1582.0	1583.9	2.80
α -Kadinol	32.408	1652.0	1656.2	0.43
α -Bisabolol	33.398	1685.0	1691.2	6.60
Fenolna jedinjenja				1.10
p-Krezol	13.373	1071.0	1073.9	1.10
Ostala jedinjenja				0.53
6-Metil-5-hepten-2-on	10.149	981.0	983.9	0.06
p-Metil anizol	11.359	1015.0	1018.4	0.06
Metil eugenol	24.708	1403.0	1399.8	0.19
Palmitinska kiselina	40.374	1959.0	1961.0	0.22
Ukupno				93.84

a) RT = Retenciono vreme; b) AIL = Aritmetički (retencioni) indeks – literaturni podaci;

c) AIE = Aritmetički (retencioni) indeks eksperimentalno određen na HP-5MS koloni.

4.5.6. Hemijski sastav etarskog ulja *P. longifolium*

Hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *P. longifolium*, prinos etarskog ulja iznosio je 0.31%, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Tepe et al., 2011). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja, identifikovano je 59 komponentata, koje predstavljaju 95.40% ukupno detektovanih supstanci (Tabela 14). U cilju hemometrijske analize ulja na osnovu hemijskog sastava, komponente *P. longifolium* ulja smo podelili na šest grupa: 1) monoterpeni ugljovodonici, 2) oksidovani monoterpeni, 3) seskviterpeni ugljovodonici, 4) oksidovani seskviterpeni, 5) fenolna jedinjenja i 6) ostala jedinjenja. Za razliku od prethodno diskutovanih ulja, monoterpeni ugljovodonici predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja (61.60%), i odlikuju se dominantnim sadržajem mircena (15.88%), α -felandrena (11.28%), limonena (8.23%), sabinena (6.56%) i p-cimena (5.92%). Seskviterpeni ugljovodonici (15.51%), predstavljaju drugu najzastupljeniju grupu i odlikuju se višim sadržajem germakrena D (3.59%). U okviru oksidovanih monoterpena (14.37%) uočen je dominantan sadržaj *cis*-sabinen hidrata (7.27%). Hemijski sastav ispitanog ulja je vrlo sličan hemijskom sastavu *P. longifolium* ulja iz Orjena u Crnoj Gori (Kapetanos et al., 2008). Oba ulja akumuliraju monoterpeni ugljovodonici kao glavna jedinjenja. Za razliku od mircena, α -pinen je dominantna komponenta etarskog ulja iz Crne Gore.

Tabela 14. Hemijski sastav etarskog ulja *P. longifolium*.

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>P. longifolium</i> (%)
Monoterpenski ugljovodonici				61.60
α -Tujen	8.169	924.0	925.2	1.93
α -Pinen	8.409	932.0	932.3	1.80
Kamfen	8.955	946.0	948.6	0.35
Sabinen	9.786	969.0	973.2	6.56
β -Pinen	9.933	974.0	977.6	2.11
Mircen	10.461	988.0	993.2	15.88
α -Felandren	11.014	1002.0	1008.9	11.28
3-Karen	11.050	1008.0	1009.9	0.43
α -Terpinen	11.307	1014.0	1017.0	0.24
p-Cimen	11.637	1020.0	1026.1	5.92
Limonen	11.837	1024.0	1031.6	8.23
β -Felandren	11.885	1025.0	1032.9	3.44
β - <i>cis</i> -Ocimen	11.996	1032.0	1036.0	0.72
β - <i>trans</i> -Ocimen	12.385	1044.0	1046.7	1.74
γ -Terpinen	12.794	1054.0	1058.0	0.66
Terpinolen	13.776	1086.0	1085.0	0.22
Allocimen	15.318	1128.0	1127.7	0.09
Oksidovani monoterpeni				14.37
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	13.361	1065.0	1073.6	7.27
<i>trans</i> -Linalool oksid	13.901	1084.0	1088.4	3.36
Perilen	14.254	1102.0	1098.2	0.25
Linalool	14.321	1095.0	1100.0	0.56
β -Tujon	14.963	1112.0	1117.8	0.06
<i>trans</i> -Pinokarveol	15.799	1135.0	1141.0	0.12
α -Felandren-8-ol	16.918	1166.0	1171.9	0.06
Izomentol	17.175	1179.0	1179.0	0.04
4-Terpineol	17.252	1174.0	1181.2	0.85
Mirtenol	17.636	1194.0	1191.8	0.04
<i>trans</i> -Dihidrokarvon	18.072	1200.0	1204.0	1.16
<i>trans</i> -Piperitol	18.237	1207.0	1208.8	0.10
<i>trans</i> -Karveol	18.581	1215.0	1218.7	0.09
Neral	19.246	1235.0	1237.8	0.02
Kuminil aldehyd	19.413	1238.0	1242.7	0.07
Karvon	19.453	1239.0	1243.9	0.06
Geranial	20.268	1264.0	1267.3	0.02
Perila aldehyd	20.559	1269.0	1275.8	0.18
Bornil acetat	20.859	1287.0	1284.4	0.06
Seskviterpenski ugljovodonici				15.51
α -Kopaen	23.905	1374.0	1375.5	0.13
β -Burbonen	24.171	1387.0	1383.6	0.09
β -Elemen	24.373	1389.0	1389.7	1.77
β -Kariofilen	25.345	1417.0	1420.0	1.30

Tabela 14. (nastavak...)

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>P. longifolium</i> (%)
γ-Element	25.629	1434.0	1429.1	0.55
β-trans-Farnezen	26.374	1454.0	1452.8	0.34
α-Humulen	26.497	1452.0	1456.7	2.64
Alloaromadendren	26.602	1458.0	1460.1	0.07
γ-Muurolen	27.083	1478.0	1475.4	0.34
Germakren D	27.304	1484.0	1482.4	3.59
β-Selinen	27.552	1489.0	1490.3	2.51
α-Selinen	27.740	1498.0	1496.4	1.43
γ-Kadinen	28.226	1513.0	1512.4	0.04
δ-Kadinen	28.374	1522.0	1517.5	0.31
Germakren B	29.606	1559.0	1559.0	0.40
Oksidovani seskviterpeni				3.55
Spatulenol	30.177	1577.0	1578.2	1.89
Kariofilen oksid	30.318	1582.0	1583.0	1.35
α-Kadinol	32.385	1652.0	1655.3	0.31
Fenolna jedinjenja				0.32
Timol	21.049	1289.0	1289.8	0.07
Karvakrol	21.329	1298.0	1297.9	0.25
Ostala jedinjenja				0.05
Heksanal	4.683	801.0	801.4	0.02
trans-2-Heksanal	5.988	846.0	850.2	0.01
n-Trikozan	48.054	2300.0	2300.1	0.02
Ukupno				95.40

^{a)} RT = Retenciono vreme; ^{b)} AIL = Aritmetički (retencioni) indeks – literarni podaci;

^{c)} AIE = Aritmetički (retencioni) indeks eksperimentalno određen na HP-5MS koloni.

4.5.7. Hemijski sastav etarskog ulja *P. officinale*

Hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *P. officinale*, prinos etarskog ulja iznosio je 0.68%, što je u saglasnosti sa literarnim podacima (Figuéredo et al., 2009). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja, identifikovano je 45 komponenata, koje predstavljaju 94.31% ukupno detektovanih supstanci (Tabela 15). U cilju hemometrijske analize ulja na osnovu hemijskog sastava, komponente *P. officinale* ulja smo podelili na šest grupa: 1) monoterpeni ugljovodoni, 2) oksidovani monoterpeni, 3) seskviterpeni ugljovodoni, 4) oksidovani seskviterpeni, 5) fenolna jedinjenja i 6) ostala jedinjenja. Slično ulju *P. longifolium*, monoterpeni ugljovodoni predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja (62.36%), i odlikuju se dominantnim sadržajem α-felandrena (16.60%), limonena (13.75%), mircena (8.75%) i p-cimena (6.72%). Seskviterpeni ugljovodoni (23.89%), predstavljaju drugu najzastupljeniju grupu jedinjenja i odlikuju se dominantnim sadržajem β-elementa (10.83%). Hemijski sastav ispitanog ulja je vrlo sličan etarskom ulju *P. officinale* sa

Tabela 15. Hemijski sastav etarskog ulja *P. officinale*.

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>P. officinale</i> (%)
Monoterpenski ugljovodonici				62.36
α -Tujen	8.167	924.0	925.2	0.77
α -Pinen	8.420	932.0	932.7	2.46
Kamfen	8.960	946.0	948.7	0.30
Sabinen	9.772	969.0	972.8	3.00
β -Pinen	9.960	974.0	978.4	4.43
Mircen	10.429	988.0	992.3	8.75
α -Felandren	11.063	1002.0	1010.3	16.60
α -Terpinen	11.321	1014.0	1017.4	0.15
p-Cimen	11.656	1020.0	1026.6	6.72
Limonen	11.902	1024.0	1033.4	13.75
β -Felandren	11.947	1025.0	1034.6	3.30
β - <i>cis</i> -Ocimen	12.004	1032.0	1036.2	0.19
β - <i>trans</i> -Ocimen	12.389	1044.0	1046.8	1.06
γ -Terpinen	12.798	1054.0	1058.1	0.28
Terpinolen	13.784	1086.0	1085.2	0.60
Oksidovani monoterpeni				7.34
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	13.338	1065.0	1073.0	3.82
<i>trans</i> -Linalool oksid	13.883	1084.0	1087.9	1.73
Perilen	14.252	1102.0	1098.1	0.08
<i>trans</i> -Pinokarveol	15.796	1135.0	1140.9	0.09
Mentofuran	16.596	1159.0	1163.0	0.14
Izomentol	17.164	1179.0	1178.8	0.04
4-Terpineol	17.245	1174.0	1181.0	0.36
<i>trans</i> -Dihidrokarvon	18.072	1200.0	1204.0	0.88
<i>trans</i> -Karveol	18.585	1215.0	1218.8	0.06
Pulegon	19.257	1233.0	1238.2	0.05
Kuminil aldehid	19.422	1238.0	1243.0	0.03
Karvon	19.459	1239.0	1244.0	0.06
Seskviterpenski ugljovodonici				23.89
α -Kopaen	23.912	1374.0	1375.8	0.07
β -Elemen	24.483	1389.0	1393.0	10.83
β -Kariofilen	25.358	1417.0	1420.5	1.10
γ -Elemen	25.671	1434.0	1430.4	2.61
α -Gvajen	25.831	1437.0	1435.5	0.03
β - <i>trans</i> -Farnezen	26.374	1454.0	1452.8	0.07
α -Humulen	26.473	1452.0	1456.0	0.37
γ -Muurolen	27.017	1478.0	1473.3	0.20
Germakren D	27.291	1484.0	1482.1	1.81
β -Selinen	27.566	1489.0	1490.8	2.99
α -Selinen	27.743	1498.0	1496.4	1.02
β -Bisabolen	28.083	1505.0	1507.7	0.35
δ -Kadinen	28.377	1522.0	1517.6	0.10

Tabela 15. (nastavak...)

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>P. officinale</i> (%)
Germakren B	29.651	1559.0	1560.5	2.34
Oksidovani seskviterpeni				0.51
Spatulenol	30.131	1577.0	1576.6	0.19
Kariofilen oksid	30.295	1582.0	1582.2	0.32
Fenolna jedinjenja				0.18
Karvakrol	21.326	1298.0	1297.8	0.18
Ostala jedinjenja				0.03
Heksanal	4.686	801.0	801.6	0.03
Ukupno				94.31

^{a)} RT = Retenciono vreme; ^{b)} AIL = Aritmetički (retencioni) indeks – literaturni podaci;
^{c)} AIE = Aritmetički (retencioni) indeks eksperimentalno određen na HP-5MS koloni.

područija severoistočnog Banata. Oba ulja akumuliraju monoterpenke ugljovodonike kao glavna jedinjenja i sadrže visok procenat α -felandrena, limonena i mircena (Figuérédo et al., 2009).

4.5.8. Hemijski sastav etarskog ulja *I. graveolens*

Hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *I. graveolens*, prinos etarskog ulja iznosio je 0.87%, što je znatno više u odnosu na literaturne podatke (Blanc et al., 2004). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja, identifikovano je 49 komponentata, koje predstavljaju 93.11% ukupno detektovanih supstanci (Tabela 16). U cilju hemometrijske analize ulja na osnovu hemijskog sastava, komponente *I. graveolens* ulja smo podelili na šest grupa: 1) monoterpenki ugljovodonici, 2) oksidovani monoterpeni, 3) seskviterpenki ugljovodonici, 4) oksidovani seskviterpeni, 5) fenolna jedinjenja i 6) ostala jedinjenja. Slično etarskim uljima ispitanih vrsta porodice Lamiaceae, oksidovani monoterpeni predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja (40.47%), i odlikuju se dominantnim sadržajem bornil acetata (21.66%) i borneola (18.66%). Oksidovani seskviterpeni (30.64%), predstavljaju drugu najzastupljeniju grupu jedinjenja i odlikuju se dominantnim sadržajem τ -kadinola (14.60%) i kariofilen oksida (9.58%). Za razliku od ovih ulja, uočen je visok procenat eukaliptola, bornil acetata, mircena i karvakrola u istraživanju Djenane et al. (2012).

4.5.9. Hemometrijska analiza hemijskog sastava ulja na osnovu grupa jedinjenja

U cilju određivanja sličnog hemijskog sastava ulja i utvrđivanja veze hemijski sastav-antibakterijska aktivnost, izvršena je hemometrijska PCA i HCA analiza ulja na osnovu dominantnih grupa jedinjenja (monoterpenki ugljovodonici, oksidovani monoterpeni, seskviterpenki ugljovodonici, oksidovani seskviterpeni, fenolna jedinjenja i ostale komponente). Prva istraživanja ovog tipa i procena sličnosti ulja na osnovu hemijskog sastava, objavljena su u studiji (Miladinović et al., 2012). Usled svojstvenih vrednosti

Tabela 16. Hemijski sastav etarskog ulja *I. graveolens*.

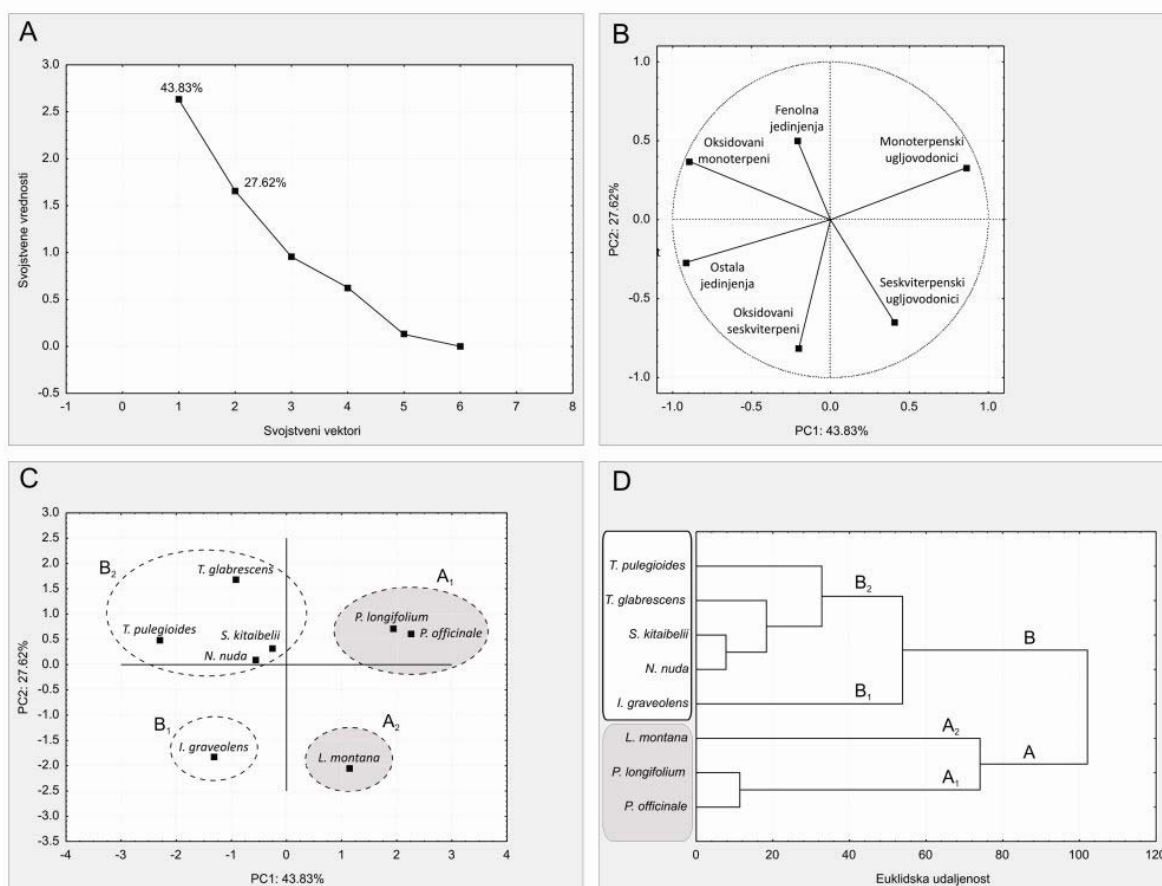
Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>I. graveolens</i> (%)
Monoterpeni ugljovodoni				2.70
α -Pinen	8.407	932.0	932.3	1.24
Kamfen	8.951	946.0	948.4	0.03
Sabinen	9.734	969.0	971.6	0.30
β -Pinen	9.901	974.0	976.6	0.23
Mircen	10.312	988.0	988.8	0.31
α -Felandren	10.902	1002.0	1005.8	0.04
α -Terpinen	11.283	1014.0	1016.3	0.01
p-Cimen	11.558	1020.0	1023.9	0.02
Limonen	11.727	1024.0	1028.6	0.07
β -Felandren	11.779	1025.0	1030.0	0.01
β - <i>trans</i> -Ocimen	12.355	1044.0	1045.9	0.38
γ -Terpinen	12.778	1054.0	1057.5	0.04
Terpinolen	13.759	1086.0	1084.5	0.02
Oksidovani monoterpeni				40.47
Linalool	14.306	1095.0	1099.7	0.07
Borneol	16.956	1165.0	1173.1	18.66
4-Terpineol	17.231	1174.0	1180.6	0.08
Bornil acetat	20.869	1287.0	1284.7	21.66
Seskviterpeni ugljovodoni				18.08
δ -Elemen	22.457	1335.0	1331.9	0.08
β -Elemen	24.373	1389.0	1389.7	1.26
α - <i>cis</i> -Bergamoten	25.120	1411.0	1412.9	0.16
β -Kariofilen	25.345	1417.0	1420.0	0.79
γ -Elemen	25.628	1434.0	1429.1	0.24
α - <i>trans</i> -Bergamoten	25.743	1432.0	1432.7	0.20
Aromadendren	25.950	1439.0	1439.3	3.01
β - <i>trans</i> -Farnezen	26.401	1454.0	1453.7	2.61
α -Humulen	26.478	1452.0	1456.1	1.69
Alloaromadendren	26.605	1458.0	1460.1	0.33
Germakren D	27.285	1484.0	1481.8	2.18
β -Selinen	27.540	1489.0	1490.0	0.35
Biciklogermakren	27.723	1500.0	1495.8	0.62
β -Bisabolen	28.084	1505.0	1507.7	0.79
δ -Kadinen	28.386	1522.0	1518.0	2.88
β -Seskvifelandren	28.573	1521.0	1524.2	0.70
Germakren B	29.612	1559.0	1559.2	0.19
Oksidovani seskviterpeni				30.64
<i>trans</i> -Nerolidol	29.705	1561.0	1562.3	0.39
Kariofilen oksid	30.304	1582.0	1582.4	9.58
τ -Kadinol	31.884	1638.0	1637.6	14.60
α -Kadinol	32.401	1652.0	1655.9	3.25
α -Bisabolol	33.396	1685.0	1691.1	2.82

Tabela 16. (nastavak...)

Identifikovana komponenta	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>I. graveolens</i> (%)
Fenolna jedinjenja				0.11
Benzil salicilat	38.090	1864.0	1869.0	0.11
Ostala jedinjenja				1.11
<i>trans</i> -2-Heksenal	5.983	846.0	850.1	0.09
<i>cis</i> -3-Heksenol	6.037	850.0	852.1	0.05
6-Metil-5-hepten-2-on	10.138	981.0	983.6	0.08
n-Dekan	10.697	1000.0	1000.2	0.02
Benzen acetaldehid	12.254	1036.0	1043.1	0.02
n-Nonanal	14.491	1100.0	1104.7	0.06
Decil acetat	24.996	1407.0	1408.9	0.24
<i>cis</i> -3-Heksenil benzoat	30.019	1565.0	1572.9	0.34
Benzil benzoat	35.454	1759.0	1767.7	0.21
Ukupno				93.11

^{a)} RT = Retenciono vreme; ^{b)} AIL = Aritmetički (retencioni) indeks – literaturni podaci; ^{c)} AIE = Aritmetički (retencioni) indeks eksperimentalno određen na HP-5MS koloni.

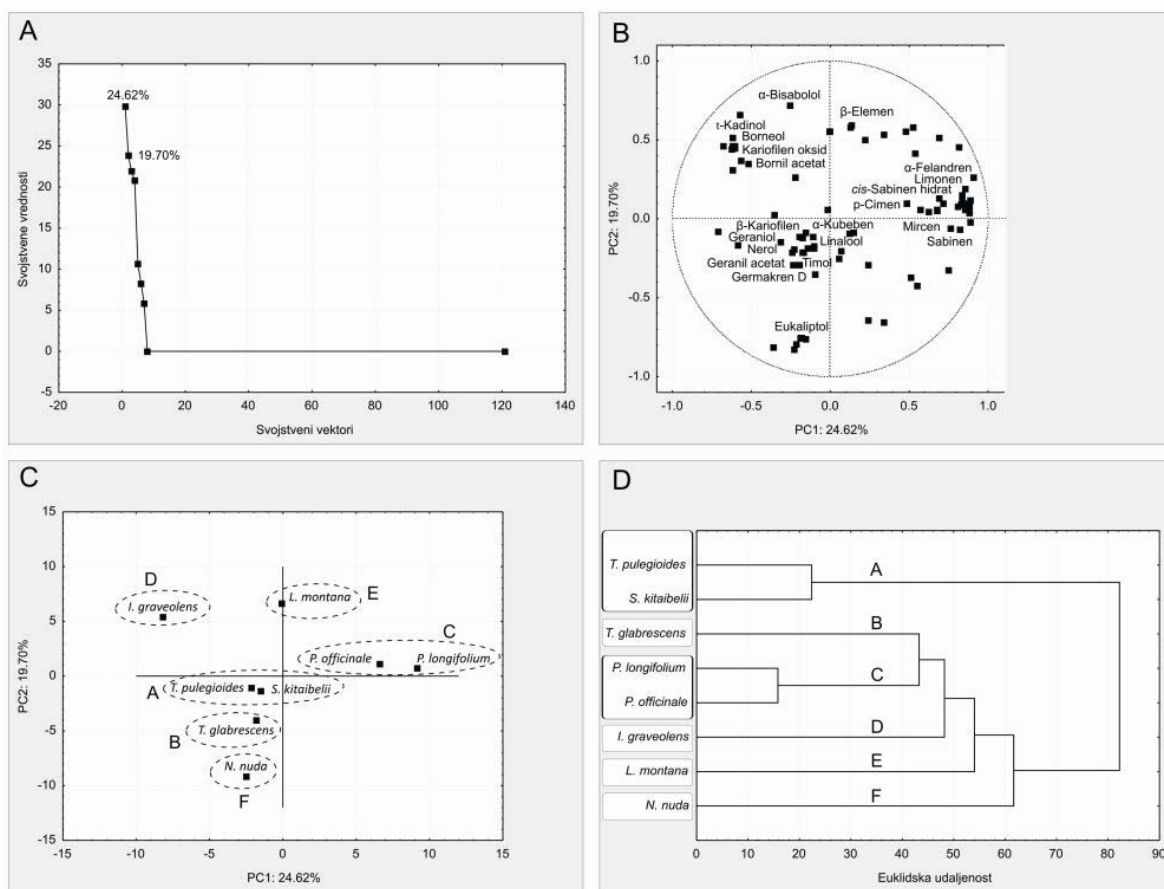
korelacionog matriksa i procenta grupa hemijskih jedinjenja (Tabele 9-16), PC1 svojstveni vektor objasnio je 43.83% varijanse ispitanih supstanci, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 27.62% (Slika 17A). Dijagram odgovornih grupa jedinjenja-varijabli (Slika 17B), ilustruje njihov uticaj na klasifikaciju posmatranih ulja (Slika 17C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 102 (Slika 17D), HCA analiza je identifikovala dve grupe ulja (A i B). Grupa A, sastavljena od *P. longifolium*, *P. officinale* i *L. montana* ulja, odlikovala se visokim sadržajem monoterpenkih i seskviterpenkih ugljovodonika i nižim sadržajem ostalih jedinjenja (Slika 17B, C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 74.1 (Slika 17D), HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (A₁ i A₂). *P. longifolium* i *P. officinale* ulja (podgrupa A₁), odlikovala su se izuzetno visokim sadržajem monoterpenkih ugljovodonika i niskim sadržajem oksidovanih monoterpena i ostalih jedinjenja (Slika 17B, C). Podgrupa A₂ (*L. montana* ulje), sadržala je najveću količinu seskviterpenkih ugljovodonika i vrlo nizak procenat oksidovanih monoterpena i ostalih jedinjenja (Slika 17B, C). Ostala ispitana ulja su svrstana u okviru grupe sa visokim sadržajem oksidovanih monoterpena, oksidovanih seskviterpena, fenolnih jedinjenja i ostalih jedinjenja (grupa B). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 53.8 (Slika 17D), HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (B₁ i B₂). Podgrupa B₁ (*I. graveolens* ulje), sadržala je najveću količinu oksidovanih seskviterpena i vrlo nizak procenat monoterpenkih ugljovodonika (Slika 17B, C). *T. pulegioides*, *T. glabrescens*, *S. kitaibelii* i *N. nuda* ulja (podgrupa B₂), odlikovala su se izuzetno visokim sadržajem oksidovanih monoterpena i niskim sadržajem monoterpenkih ugljovodonika (Slika 17B, C).



Slika 17. Hemometrijska analiza hemijskog sastava etarskih ulja zasnovana na sadržaju dominantnih grupa jedinjenja: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih grupa jedinjenja; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih ulja; (D) dendrogram HCA analize.

4.5.10. Hemometrijska analiza ulja na osnovu svih hemijskih komponentata

U cilju još temeljnije analize ulja i pronalaska komponenta koje bi mogle objasniti njihovu antibakterijsku sličnost, izvršena je hemometrijska PCA i HCA analiza ulja na osnovu svih hemijskih jedinjenja. Kao što je u prethodnom poglavlju naglašeno, utvrđivanje odnosa hemijskog sastava etarskog ulja i njegove antibakterijske aktivnosti korišćenjem hemometrijskih metoda analize prvi put je započet a kasnije i proširen u istraživanjima Miladinović et al. (2012, 2013, 2014). Usled svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa i procenta svih hemijskih jedinjenja (Tabele 9-16), PC1 svojstveni vektor objasnio je 24.62% varijanse ispitanih supstanci, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 19.70% (Slika 18A). Dijagram odgovornih komponentata-varijabli (Slika 18B), ilustruje njihov uticaj na klasifikaciju posmatranih ulja (Slika 18C). Ovde treba naglasiti da su na Slici 18B, označene samo one komponente čiji je procenat u uljima iznad 5%, u cilju bolje preglednosti i uočavanja komponenti koje najviše doprinose varijansi. Na osnovu euclidiske udaljenosti i



Slika 18. Hemometrijska analiza hemijskog sastava etarskih ulja zasnovana na sadržaju svih komponenata ulja: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih jedinjenja; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih ulja; (D) dendrogram HCA analize.

sličnosti ≥ 43.3 (Slika 18D), HCA analiza je identifikovala šest grupa ulja (A, B, C, D, E i F). Na samom početku analize, vidimo da od 8 ispitanih ulja, postoje čak 6 grupa, koje se bitno razlikuju po sadržaju određenih komponenti. Grupa A, sastavljena od *T. pulegioides* i *S. kitaibelii* ulja, odlikovala se izrazito visokim sadržajem geraniola. Pored geraniola, sličnost je zapažena u sadržaju linaloola, nerola i β -kariofilena (Slika 18B, C). *T. glabrescens*, iako istog roda kao i *T. pulegioides*, svrstan je u okviru grupe B. Visok procenat timola (13.79%) i geranil acetata (19.38%), bio je osnovni uzrok njegovog podvajanja u odnosu na prethodno diskutovana ulja (Slika 18B, C). Grupa C, sastavljena od *P. longifolium* i *P. officinale* ulja, odlikovala se visokim sadržajem pojedinih monoterpena. Visok procenat α -felandrena, mircena, limonena, p-cimena, sabinena i *cis*-sabinen hidrata predstavlja karakteristiku ove grupe (Slika 18B, C). Jedino ispitano etarsko ulje familije Asteraceae, *I. graveolens*, svrstano

je u okviru grupe D. Visok procenat bornil acetata (21.66%), borneola (18.66%), τ -kadinola (14.60%) i kariofilen oksida (9.58%) bio je osnovni uzrok njegovog izdvajanja u odnosu na prethodno diskutovana ulja (Slika 18B, C). Usled izuzetno visokog sadržaja β -elemena (40.43%) i α -bisabolola (6.60%), etarsko ulje *L. montana* je svrstano u okviru grupe E.

Hemometrijskom PCA i HCA analizom, etarsko ulje *N. nuda* je svrstano u okviru zasebne grupe (grupa F). Visok procenat eukaliptola (45.96%) bio je osnovni uzrok njegovog podvajanja u odnosu na prethodno diskutovana ulja (Slika 18B, C). Na osnovu ispitanih ulja rodova *Thymus* i *Peucedanum*, vidimo da biljne vrste u okviru istog roda mogu a i ne moraju imati sličan hemijski sastav. Kao što je već naglašeno, osim genetske predispozicije biljne vrste, edafski uslovi sredine i različita faza vegetacije mogu uticati na različiti hemijski sastav ulja. Ovo će biti još izraženije ukoliko se radi o biljnim vrstama različitih rodova ili različitih familija. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja, zahteva sistematsku i detaljnu hemijsku analizu, primenom najsavremenijih metoda i tehnika. U cilju uočavanja i tumačenja odnosa između hemijskog sastava supstanci i njihovog biološkog efekta, hemometrijske i hemoinformatičke metode nesumnjivo zauzimaju značajno mesto (Miladinović et al., 2012; Ilić et al., 2014).

4.6. Antibakterijska aktivnost ispitanih supstanci

Antibakterijska aktivnost etarskih ulja, dominantnih komponenata ulja i antibiotika ispitana je na trinaest referentnih ATCC sojeva. Ispitani Gram-negativni sojevi su: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ispitani Gram-pozitivni sojevi su: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 i *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Rezultati antibakterijske aktivnosti ispitanih supstanci, prikazani su MIC i MBC vrednostima i izraženi su jedinicom $\mu\text{g/ml}$.

Antibakterijska aktivnost ispitanih etarskih ulja familije Lamiaceae data je u Tabeli 17. Rezultati pokazuju izraženu antibakterijsku aktivnost ulja na sve proučavane bakterijske sojeve. Etarsko ulje *T. pulegioides*, je pokazalo antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije, sa MIC vrednostima u opsegu 155.2-4966.4 $\mu\text{g/ml}$ i MBC vrednostima 155.2-9932.8 $\mu\text{g/ml}$. Vrednosti MIC etarskog ulja *T. glabrescens* su u intervalu 627.1-10033.6 $\mu\text{g/ml}$ dok su MBC vrednosti u opsegu 627.1-20067.2 $\mu\text{g/ml}$. Na osnovu MIC i MBC ispitanih ulja, možemo uočiti nešto slabiju antibakterijsku aktivnost *T. glabrescens* ulja u odnosu na *T. pulegioides*, što se može objasniti njihovim različitim hemijskim sastavom.

Tabela 17. Antibakterijska aktivnost ispitanih etarskih ulja familije Lamiaceae ($\mu\text{g/ml}$).

Br.	Bakterijski soj	<i>T. pulegioides</i>		<i>T. glabrescens</i>		<i>S. kitaibelii</i>		<i>N. nuda</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1241.6	2483.2	2508.4	5016.8	1279.2	2558.4	5331.2	21324.8
2	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	310.4	310.4	627.1	627.1	1279.2	1279.2	2665.6	5331.2
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	620.8	620.8	1254.2	1254.2	2558.4	2558.4	2665.6	2665.6
4	<i>Klabsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	1241.6	4966.4	5016.8	10033.6	2558.4	10233.6	5331.2	21324.8
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1241.6	1241.6	1254.2	2508.4	1279.2	1279.2	21324.8	42649.6
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4966.4	9932.8	10033.6	20067.2	20467.2	40934.4	2665.6	42649.6
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1241.6	2483.2	5016.8	5016.8	2558.4	5116.8	10662.4	10662.4
8	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	620.8	620.8	5016.8	5016.8	40934.4	81868.8	21324.8	85299.2
9	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	1241.6	1241.6	2508.4	2508.4	1279.2	5116.8	1332.8	5331.2
10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	155.2	155.2	627.1	1254.2	2558.4	10233.6	83.3	666.4
11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	310.4	310.4	627.1	627.1	319.8	2558.4	1332.8	2665.6
12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2483.2	9932.8	2508.4	2508.4	2558.4	10233.6	1332.8	5331.2
13	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	310.4	310.4	627.1	1254.2	319.8	639.6	166.6	1332.8

Naša istraživanja proteklih godina, bila su usmerena na ispitivanju povećanja antibakterijske aktivnosti antibiotika etarskim uljima. Rezultati kombinovane interakcije ulja *T. pulegioides* i antibiotika, objašnjeni su u publikaciji (Miladinović et al., 2013).

Na osnovu rezultata (Tabela 17), etarsko ulje *S. kitaibelii* je delovalo na sve testirane sojeve inhibitorno u intervalu 319.8-40934.4 µg/ml i baktericidno u opsegu 639.6-81868.8 µg/ml. Na osnovu naših saznanja i dostupne literature, kombinovane interakcije etarskog ulja *S. kitaibelii* i antibiotika nisu proučene.

Etarsko ulje *N. nuda*, je pokazalo antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije, sa MIC vrednostima u opsegu 83.3-21324.8 µg/ml i MBC vrednostima 666.4-85299.2 µg/ml (Tabela 17). I pored iscrpnog istraživanja, rezultati kombinovane interakcije etarskog ulja *N. nuda* i antibiotika do sada nisu ispitani.

Antibakterijska aktivnost etarskih ulja familija Apiaceae i Asteraceae data je u Tabeli 18. Rezultati pokazuju antibakterijsku aktivnost ulja na sve proučavane bakterijske sojeve. Etarsko ulje *L. montana* je pokazalo antibakterijsku aktivnost na sve testirane sojeve, sa MIC vrednostima u opsegu 337.7-43225.6 µg/ml i MBC vrednostima 675.4-43225.6 µg/ml. Vrednosti MIC etarskog ulja *P. longifolium* su u intervalu 2427.2-19417.6 µg/ml dok su MBC vrednosti u opsegu 2427.2-38835.2 µg/ml.

Na osnovu rezultata (Tabela 18), etarsko ulje *P. officinale* je delovalo inhibitorno i baktericidno na sve testirane sojeve u intervalu 2406.2-76998.4 µg/ml. Na osnovu dostupne literature i naših saznanja, antibakterijska aktivnost *P. officinale* ulja i kombinacije istog sa antibioticima, do sada nije ispitana.

Etarsko ulje familije Asteraceae, *I. graveolens*, je pokazalo antibakterijsku aktivnost na sve testirane sojeve, sa MIC vrednostima u opsegu 569.4-18220.8 µg/ml i MBC vrednostima 569.4-36441.6 µg/ml. I pored iscrpnog istraživanja, rezultati kombinovane interakcije etarskog ulja *I. graveolens* i antibiotika do sada nisu ispitani.

Na osnovu hemijskog sastava ispitanih ulja i dostupnosti čistih supstanci, izvršena je antibakterijska analiza pojedinih komponenata ulja. Rezultati antibakterijske aktivnosti ispitanih supstanci i dominantnih komponenata ulja, dati su u Tabeli 19 i Tabeli 20.

Antibakterijska aktivnost geraniola, glavne komponente etarskih ulja *T. pulegioides*, *T. glabrescens* i *S. kitaibelii*, data je u Tabeli 19. Geraniol je pokazao antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije, sa MIC vrednostima u opsegu 1386.8-5547.2 µg/ml i MBC vrednostima 1386.8-11094.2 µg/ml. Aktivnost geraniola prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim sojevima je predmet mnogih studija (Kim et al., 1995; Jirovetz et al., 2007; Kotan et al., 2007). Značajan broj studija, povezuje antibakterijsku aktivnost etarskih ulja sa

Tabela 18. Antibakterijska aktivnost ispitanih etarskih ulja familija Apiaceae i Asteraceae ($\mu\text{g/ml}$).

Br.	Bakterijski soj	<i>L. montana</i>		<i>P. longifolium</i>		<i>P. officinale</i>		<i>I. graveolens</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21612.8	43225.6	9708.8	19417.6	76998.4	76998.4	9110.4	9110.4
2	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	675.4	10806.4	4854.4	9708.8	4812.4	9624.8	4555.2	9110.4
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	675.4	1350.8	9708.8	9708.8	9624.8	9624.8	9110.4	9110.4
4	<i>Klasiella pneumoniae</i> ATCC 700603	21612.8	43225.6	19417.6	38835.2	76998.4	76998.4	18220.8	18220.8
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	10806.4	21612.8	9708.8	19417.6	38499.2	76998.4	4555.2	4555.2
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	5403.2	5403.2	9708.8	19417.6	9624.8	19249.6	9110.4	36441.6
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	43225.6	43225.6	19417.6	38835.2	38499.2	38499.2	18220.8	18220.8
8	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	5403.2	10806.4	9708.8	19417.6	9624.8	19249.6	4555.2	9110.4
9	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	1350.8	1350.8	2427.2	2427.2	2406.2	2406.2	569.4	569.4
10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	337.7	675.4	4854.4	4854.4	4812.4	4812.4	569.4	569.4
11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	675.4	675.4	9708.8	9708.8	9624.8	9624.8	1138.8	1138.8
12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2701.6	10806.4	4854.4	4854.4	19249.6	19249.6	4555.2	18220.8
13	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	675.4	675.4	4854.4	9708.8	4812.4	9624.8	1138.8	1138.8

Tabela 19. Antibakterijska aktivnost ispitanih komponenata ulja ($\mu\text{g/ml}$).

Br.	Bakterijski soj	Geraniol		Timol		Linalool		Eukaliptol	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1386.8	2773.6	1561.6	1561.6	1340.6	2681.2	5900.8	5900.8
2	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	2773.6	2773.6	24.4	24.4	5362.4	5362.4	737.6	5900.8
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	2773.6	5547.2	390.4	390.4	10724.8	10724.8	47206.4	47206.4
4	<i>Klasiella pneumoniae</i> ATCC 700603	2773.6	5547.2	1561.6	3123.2	10724.8	21449.6	5900.8	5900.8
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1386.8	1386.8	1561.6	1561.6	5362.4	10724.8	5900.8	11801.6
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	5547.2	11094.4	1561.6	1561.6	10724.8	10724.8	23603.2	23603.2
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2773.6	2773.6	3123.2	6246.4	10724.8	21449.6	94412.8	94412.8
8	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	5547.2	5547.2	195.2	195.2	10724.8	10724.8	11801.6	47206.4
9	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	1386.8	1386.8	195.2	195.2	5362.4	5362.4	1475.2	5900.8
10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	1386.8	1386.8	24.4	24.4	5362.4	5362.4	92.2	184.4
11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2773.6	2773.6	97.6	97.6	2681.2	5362.4	5900.8	23603.2
12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2773.6	2773.6	780.8	1561.6	2681.2	5362.4	94412.8	94412.8
13	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	2773.6	2773.6	97.6	97.6	5362.4	5362.4	184.4	737.6

Tabela 20. Antibakterijska aktivnost geranil acetata i limonena ($\mu\text{g/ml}$).

Br.	Bakterijski soj	Geranil acetat		Limonen	
		MIC	MBC	MIC	MBC
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	–	–	–	–
2	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	5862.4	46899.2	10513.6	10513.6
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	11724.8	23449.6	10513.6	10513.6
4	<i>Klabsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	–	–	–	–
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	–	–	–	–
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	23449.6	93798.4	10513.6	21027.2
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	–	–
8	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	93798.4	93798.4	21027.2	21027.2
9	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	2931.2	2931.2	5256.8	5256.8
10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	91.6	183.2	5256.8	5256.8
11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	183.2	183.2	2628.4	2628.4
12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	–	–	–	–
13	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	183.2	732.8	5256.8	10513.6

aktivnošću glavne komponente-geraniolom (Mnif et al., 2011; Schmidt et al., 2012; Santos & Novales, 2012; Singh et al., 2012). U malom broju radova ispitana je antibakterijska aktivnost kombinacije geraniola i antibiotika (Shin, 2003; Shin & Lim, 2004; Khan, 2012). Prva istraživanja kombinove interakcije geraniola sa hloramfenikolom objašnjeni su u publikaciji Ilić et al. (2014). Na osnovu naših saznanja i dostupne literature, kombinovane interakcije geraniola sa tetraciklinom i streptomycinom do sada nisu ispitane.

Timol, druga po zastupljenosti komponenta etarskog ulja *T. glabrescens*, pokazala je antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije, sa MIC vrednostima u opsegu 24.4-3123.2 $\mu\text{g/ml}$ i MBC vrednostima 24.4-6246.4 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 19). Aktivnost timola prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim sojevima je predmet mnogih studija (Braga 2005; Zarrini et al., 2010; Gniewosz & Synowiec, 2011). Značajan broj studija, povezuje antibakterijsku aktivnost etarskih ulja sa aktivnošću glavne komponente-timolom (Stefanakis et al., 2013; Ballester-Costa et al., 2013; Gokturk et al., 2013). U znatnom broju radova ispitana je antibakterijska aktivnost kombinacije timola i antibiotika (Guo et al., 2009; Palaniappan & Holley, 2010; Ahmad et al., 2013; Pemmaraju et al., 2013; Hamoud et al., 2013). Prva istraživanja kombinove interakcije timola sa hloramfenikolom objašnjeni su u publikaciji Ilić et al. (2014). Na osnovu naših saznanja i dostupne literature, kombinovane interakcije timola sa tetraciklinom i streptomycinom do sada nisu ispitane.

Linalool, jedna od dominantnih komponenta etarskog ulja *T. glabrescens*, pokazala je antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije, sa MIC vrednostima u opsegu 1340.6-10724.8 µg/ml i MBC vrednostima 2681.2-21449.6 µg/ml (Tabela 19). Aktivnost linaloola prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim sojevima je predmet mnogih studija (Aprotosoae et al., 2014; Beier et al., 2014). Značajan broj studija, povezuje antibakterijsku aktivnost etarskih ulja sa aktivnošću glavne komponente-linaloolom (Végh et al., 2012; Adaszyńska et al., 2013; Eryiğit et al., 2014). Na osnovu dostupne literature, antibakterijska aktivnost kombinacije linaloola i antibiotika ispitana je samo u jednoj studiji (Sook & Shin, 2007). Ispitivanje linaloola "checkerboard" metodom uglavnom se zasnivalo na njegovoj kombinaciji sa etarskim uljem, ili nekom od glavnih komponenata ulja (Iten et al., 2009; Tserennadmid et al., 2011). Na osnovu naših saznanja i dostupne literature, kombinovane interakcije linaloola sa hloramfenikolom, tetraciklinom i streptomycinom do sada nisu ispitane.

Eukaliptol, dominantna komponenta etarskog ulja *N. nuda*, pokazala je antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije, sa MIC vrednostima u opsegu 92.2-94412.8 µg/ml i MBC vrednostima 184.4-94412.8 µg/ml (Tabela 19). Aktivnost eukaliptola prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim sojevima je predmet mnogih studija (Bosnić et al., 2006; Van Vuuren & Viljoen, 2007; Hendry et al., 2009). Značajan broj studija, povezuje antibakterijsku aktivnost etarskih ulja sa aktivnošću glavne komponente-eukaliptola (Hassine et al., 2013; Jianu et al., 2013; Ben Hsouna et al., 2013). Na osnovu dostupne literature, antibakterijska aktivnost kombinacije eukaliptola i antibiotika ispitana je u malom broju studija (Jedlicková et al., 1992; Hendry et al., 2009). Na osnovu naših saznanja i dostupne literature, kombinovane interakcije eukaliptola sa hloramfenikolom, tetraciklinom i streptomycinom do sada nisu ispitane.

Geranil acetat, jedna od dominantnih komponenata etarskog ulja *T. glabrescens*, pokazala je antibakterijsku aktivnost samo na određene bakterijske sojeve, sa MIC vrednostima u opsegu 91.6-93798.4 µg/ml i MBC vrednostima 183.2-93798.4 µg/ml (Tabela 20). Aktivnost geranil acetata prema ispitanim "checkerboard" sojevima nije zabeležena (Tabela 20). Potvrda slabe ili neaktivne uloge geranil acetata prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim sojevima je predmet nekih od studija (Duarte et al., 2007; Sarath Chandra Bose et al., 2013). Značajan broj studija, povezuje antibakterijsku aktivnost etarskih ulja sa aktivnošću glavnih komponenta, pa i sa sadržajem geranil acetata (El-Baky & El-Baroty, 2008; Farjam, 2012; Rokbeni et al., 2013). Mali broj studija govori o antibakterijskoj aktivnosti kombinacije antibiotika i ulja u kome je geranil acetat dominantna komponenta (Veras et al., 2011). Na

osnovu naših saznanja i dostupne literature, kombinovane interakcije geranil acetata sa ispitanim antibioticima i čistim supstancama nisu proučavane.

Limonen, jedna od dominantnih komponenata etarskih ulja *P. officinale* i *P. longifolium*, pokazala je antibakterijsku aktivnost samo na određene bakterijske sojeve, sa MIC i MBC vrednostima u opsegu 2628.4-21027.2 µg/ml (Tabela 20). Aktivnost limonena prema ispitanim "checkerboard" sojevima nije zabeležena (Tabela 20). Ovo je u saglasnosti sa literaturnim podacima gde je potvrđena slaba antibakterijska aktivnost limonena (Burt, 2004; Bourgou et al., 2012; Maree et al., 2014). Značajan broj studija, povezuje antibakterijsku aktivnost etarskih ulja sa aktivnošću glavnih komponenta, pa i sa sadržajem limonena (Sonboli et al., 2012; Haj Ammar et al., 2012; Matan et al., 2014). Mali broj studija govori o antibakterijskoj aktivnosti kombinacija supstanci i ulja u kome je limonen dominantna komponenta (Tserennadmid et al., 2011; Bassolé et al., 2011; Zhang et al., 2014). Na osnovu naših saznanja i dostupne literature, kombinovane interakcije limonena sa ispitanim antibioticima i čistim supstancama nisu istražene.

Antibakterijska aktivnost ispitanih antibiotika data je u Tabeli 21. Rezultati pokazuju izraženu antibakterijsku aktivnost antibiotika na sve proučavane bakterijske sojeve. Hloramfenikol je pokazao antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije, sa MIC vrednostima u opsegu 1.0-1024.0 µg/ml i MBC vrednostima 1.0-2048.0 µg/ml. Vrednosti MIC i MBC tetraciklina su u intervalu 0.5-1024.0 µg/ml, dok su kod streptomicina MIC vrednosti bile u opsegu 0.5-128.0 µg/ml a MBC vrednosti u opsegu 0.5-256.0 µg/ml. Na osnovu MIC i MBC ispitanih antibiotika možemo uočiti nešto slabiju antibakterijsku aktivnost u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *S. aureus* ATCC 29213. Ovo je upravo i razlog zašto smo se u "checkerboard" metodi opredelili baš za ove sojeve. Cilj istraživanja nam je bio povećanje antibakterijske aktivnosti antibiotika ka rezistentnim Gram-negativnim i Gram-pozitivnim sojevima, korišćenjem etarskih ulja ili dominantnih komponenata ulja. Poznate su brojne studije o antibakterijskoj aktivnosti ispitanih antibiotika i mehanizmu njihovog delovanja (Carter et al., 2000; Brodersen et al., 2000; Bulkley et al., 2010). Važna mesta antibakterijske aktivnosti ispitanih antibiotika, dostupni su na web adresi (<http://www.drugbank.ca/drugs/>).

Znatan broj studija ispituju efekte kombinovanja sintetičkih antibiotika sa prirodnim supstancama (Olajuyigbe & Afolayan, 2012; Stefanović et al., 2012; Din et al., 2013; Gutiérrez-Fernández et al., 2013). U ovim studijama, nije sasvim jasan, niti objašnjen mehanizam antibakterijske aktivnosti etarskih ulja kao i mehanizam njihove kombinovane

Tabela 21. Antibakterijska aktivnost ispitanih antibiotika ($\mu\text{g/ml}$).

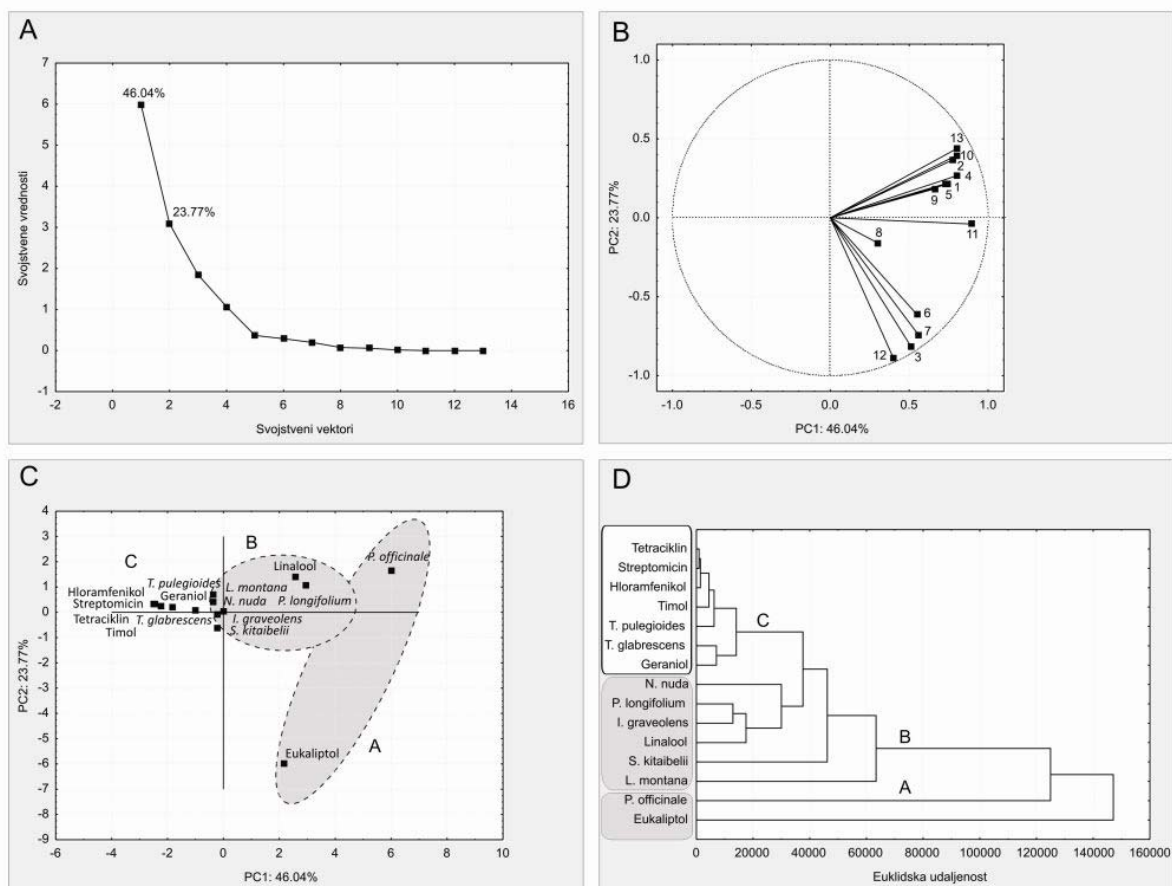
Br.	Bakterijski soj	Hloramfenikol		Tetraciklin		Streptomycin	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128.0	512.0	128.0	256.0	8.0	8.0
2	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	4.0	8.0	1.0	8.0	4.0	4.0
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	2.0	2.0	1.0	1.0	16.0	16.0
4	<i>Klasiella pneumoniae</i> ATCC 700603	512.0	1024.0	128.0	256.0	64.0	64.0
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	4.0	64.0	1024.0	1024.0	128.0	256.0
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4.0	16.0	4.0	32.0	8.0	8.0
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1024.0	2048.0	128.0	256.0	16.0	16.0
8	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	1.0	1.0	0.5	8.0	0.5	0.5
9	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	2.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	1.0	4.0	0.5	0.5	0.5	0.5
11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.0	8.0	1.0	1.0	0.5	0.5
12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	8.0	32.0	128.0	256.0	4.0	32.0
13	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	8.0	8.0	1.0	2.0	1.0	1.0

interakcije sa antibioticima. Neke od studija upućuju na lakši prodor antibiotika do njihovih target mesta, usled porasta fluidnosti citoplazmatične membrane i njenog penetriranja komponentama ulja. Jedan deo naših publikovanih rezultata, vezan za interakcije ispitanih antibiotika, ulja i čistih supstanci dat je u prilogu ove doktorske disertacije (Ilić et al., 2014; Miladinović et al., 2014). Kao što je već rečeno, na osnovu naših saznanja i dostupne literature, kombinovane interakcije hloramfenikola, tetraciklina i streptomicina sa ispitanim uljima i supstancama do sada nisu proučavane.

Klasifikacija i upoređivanje supstanci na osnovu njihove antibakterijske aktivnosti je jedino objektivno moguće korišćenjem odgovarajućih hemometrijskih metoda (Miladinović et al., 2012). Interpretacija i diskusija tabelarno prezentovanih rezultata je vrlo subjektivna. U cilju uočavanja određenih korelacija i eliminacije bilo kakve subjektivne analize, hemometrijske PCA i HCA metode su primenjene.

4.6.1. Hemometrijska analiza supstanci na osnovu MIC vrednosti

U cilju određivanja slične inhibitorne aktivnosti supstanci i utvrđivanja veze hemijski sastav-antibakterijska aktivnost, izvršena je hemometrijska PCA i HCA analiza supstanci na osnovu MIC vrednosti (Miladinović et al., 2012; Miladinović et al., 2013; Miladinović et al., 2014; Ilić et al., 2014). Usled svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa i MIC vrednosti (Tabele 17-21), izuzimajući rezultate geranil acetata i limonena, PC1 svojstveni vektor objasnio je 46.04% varijanse ispitanih supstanci, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 23.77% (Slika 19A). Dijagram odgovornih bakterijskih sojeva-varijabli (Slika 19B), ilustruje uticaj MIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih supstanci (Slika 19C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 37596 (Slika 19D), HCA analiza je identifikovala tri grupe supstanci (A, B i C). Grupa A, sastavljena od *P. officinale* ulja i eukaliptola, odlikovala se slabom antibakterijskom aktivnošću i visokim MIC vrednostima. Visoku rezistenciju na eukaliptol pokazali su sojevi *K. pneumoniae* ATCC 10031, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *S. aureus* ATCC 29213 (Slika 19B, C). Vrlo slabi rezultati antibakterijske aktivnosti ulja *P. officinale* dobijeni su u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *P. mirabilis* ATCC 12453 (Slika 19B, C). Grupa B, grupa najvećeg broja ispitanih ulja, odlikovala se umerenim i višim vrednostima inhibitorne koncentracije u odnosu na sve ispitane supstance. Razmatrajući sve bakterije, najjaču antibakterijsku aktivnost pokazali su antibiotici i ulja timusa sa svojim glavnim komponentama (Slika 19B, C). Ove supstance su svrstane u okviru grupe C.

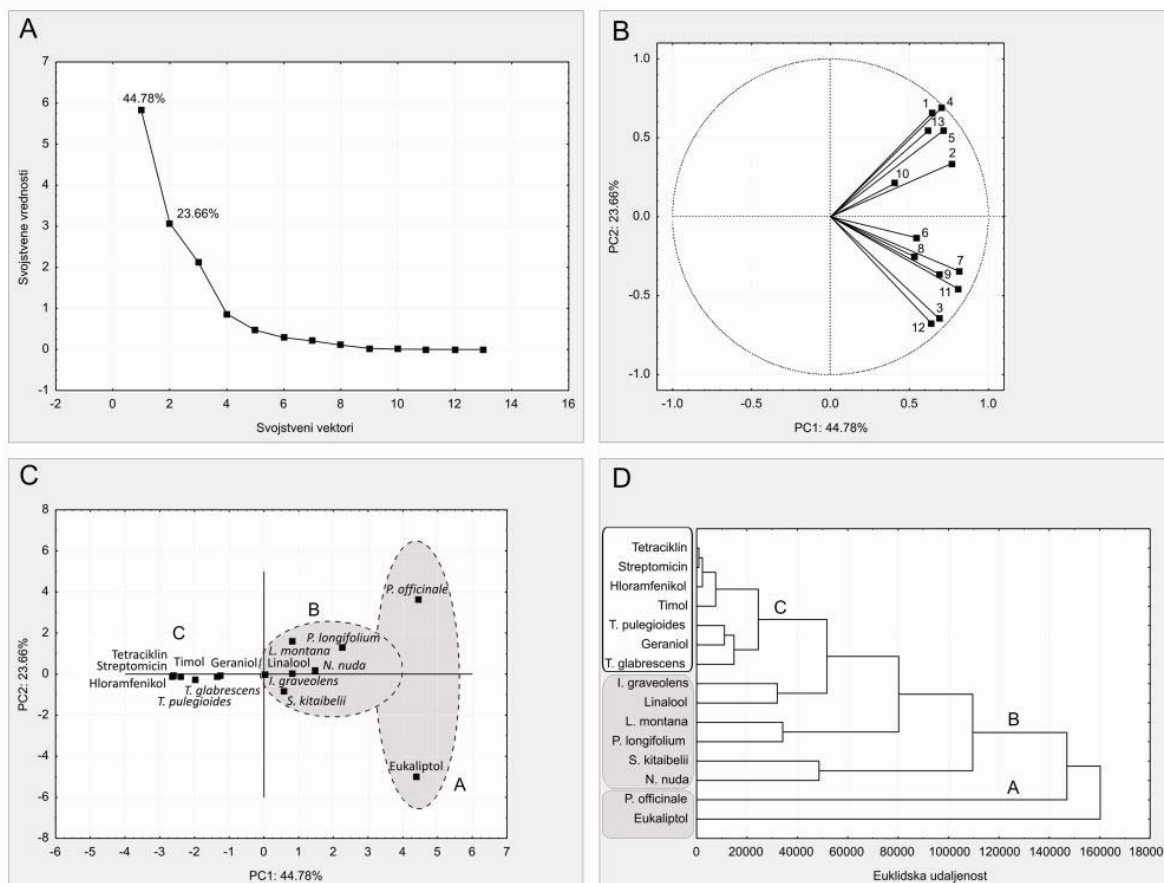


Slika 19. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti supstanci zasnovana na MIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih bakterijskih sojeva; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih supstanci; (D) dendrogram HCA analize.

4.6.2. Hemometrijska analiza supstanci na osnovu MBC vrednosti

U cilju određivanja slične baktericidne aktivnosti supstanci i pronalaska veze hemijski sastav-antibakterijska aktivnost, izvršena je hemometrijska PCA i HCA analiza supstanci na osnovu MBC vrednosti. Usled svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa i MBC vrednosti (Tabele 17-21), izuzimajući rezultate geranil acetata i limonena, PC1 svojstveni vektor objasnio je 44.78% varijanse ispitanih supstanci, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 23.66% (Slika 20A). Dijagram odgovornih bakterijskih sojeva-varijabli (Slika 20B), ilustruje uticaj MBC vrednosti na klasifikaciju posmatranih supstanci (Slika 20C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 51696 (Slika 20D), HCA analiza je identifikovala tri grupe supstanci (A, B i C). Grupa A, sastavljena od *P. officinale* ulja i eukaliptola, odlikovala se slabom aktivnošću i visokim MBC vrednostima. Visoku rezistenciju na eukaliptol pokazivali su sojevi *K. pneumoniae* ATCC 10031, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. aerogenes* ATCC 13048, *S. aureus* ATCC 25923 i *S. aureus* ATCC 29213 (Slika

20B, C). Vrlo slabi rezultati antibakterijske aktivnosti ulja *P. officinale* dobijeni su u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *P. mirabilis* ATCC 12453 (Slika 20B, C). Grupa B, grupa najvećeg broja ispitanih ulja, odlikovala se umerenim i višim vrednostima baktericidne koncentracije u odnosu na sve ispitane supstance. Razmatrajući sve bakterije, najjaču baktericidnu aktivnost pokazali su antibiotici i ulja timusa sa svojim glavnim komponentama (Slika 20B, C). Ove supstance, hemometrijskom PCA i HCA analizom su svrstane u okviru grupe C. Slični rezultati dobijeni su analizom MIC vrednosti.



Slika 20. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti supstanci zasnovana na MBC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih bakterijskih sojeva; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih supstanci; (D) dendrogram HCA analize.

4.6.3. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

T. pulegioides ulje-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između ispitano ulja i antibiotika dati su u Tabeli 22. Na osnovu 135 ispitanih odnosa (kombinacija) između etarskog ulja *T. pulegioides* i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 69 (51.11%) su pokazali sinergističko

delovanje, 36 (26.67%) aditivno dejstvo dok 30 (22.22%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Tabela 22. Antibakterijska aktivnost sistema *T. pulegioides* ulje-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

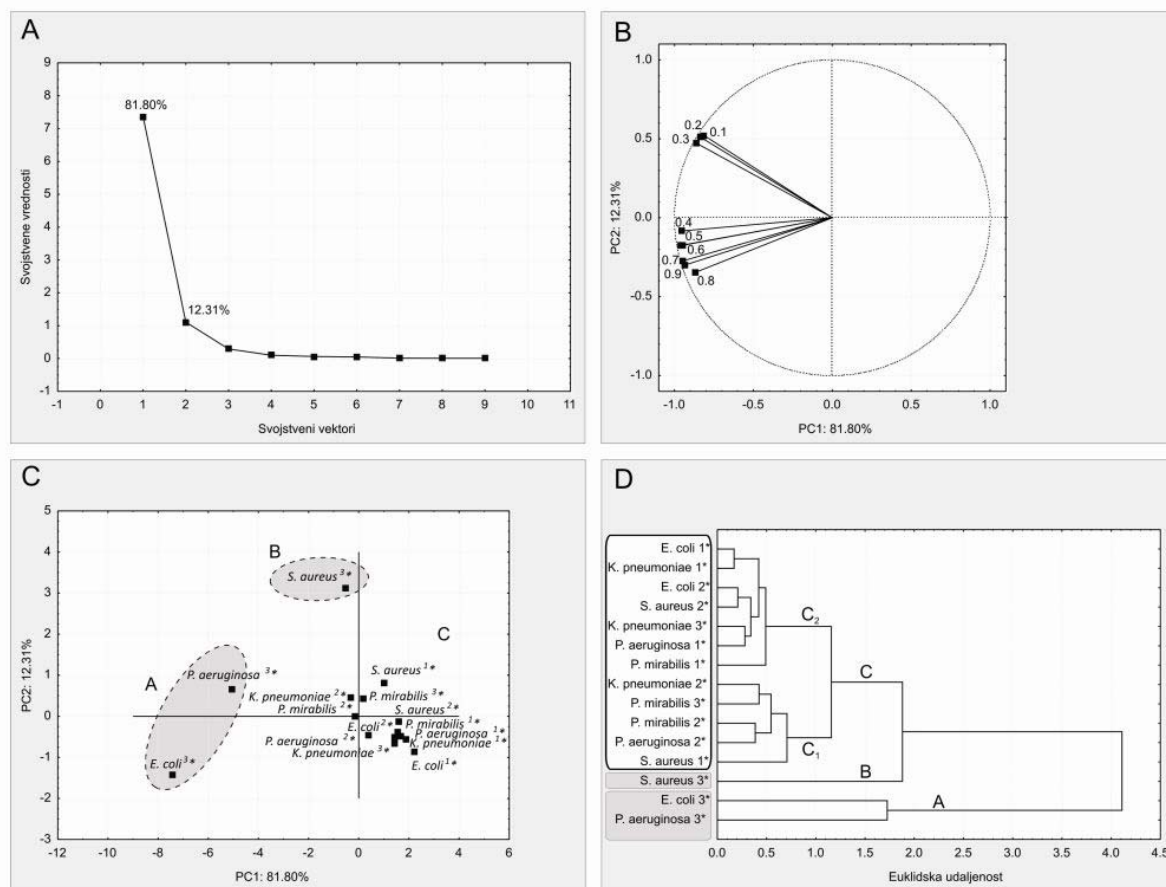
Bakterija	FIC _A indeksi <i>T. pulegioides</i> ulja									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.43	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	1.04	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.32	0.32	0.56	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.92	0.82	1.10	0.95	0.92	1.04	1.16	1.28
	^{3*}	0.32	0.44	0.56	0.82	0.80	0.76	0.87	1.16	1.09
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.54	0.44	0.43	0.54	0.80	0.76	1.04	0.98	1.28
	^{2*}	0.76	0.56	0.95	0.82	0.95	1.08	1.04	1.34	1.28
	^{3*}	0.54	0.92	0.95	0.82	0.95	0.92	1.04	1.16	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.43	0.32	0.56	0.68	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.56	0.69	0.82	0.95	1.08	1.04	1.16	1.28
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.04	1.72	1.34	1.85
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.87	0.68	0.69	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.43	0.56	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09

* Ispitani sistemi: ulje-hloramfenikol (^{1*}); ulje-tetraciklin (^{2*}); ulje-streptomicin (^{3*}).

Najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom ispitanoeg etarskog ulja sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 75.56%. Najviši procenat aditivnog dejstva (37.78%) zabeležen je u kombinaciji ulje-tetraciklin, dok je najviši procenat antagonizma (51.11%) zabeležen u interakciji ulja sa streptomicinom. Najbolji rezultati kombinovane interakcije ispitanoeg ulja i antibiotika su postignuti na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213. Na ovom soju, kombinacija ulje-antibiotik je pokazala 66.67% sinergističkih interakcija, 22.22% aditivnih interakcija i 11.11% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (11.11%), *P. mirabilis* ATCC 12453 (14.81%), *E. coli* ATCC 25922 (33.33%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (40.74%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 22, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema ulje-hloramfenikol, 34 (75.56%) interakcija su sinergističke, 10 (22.22%) aditivne, dok 1 (2.22%) interakcija pokazuje antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema ulje-tetraciklin su sledeći: 22 (48.89%) interakcije pokazuju sinergizam, 17 (37.78%) aditivno

dejstvo, dok 6 (13.33%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem ulje-streptomicin, dao je 13 (28.89%) sinergističkih, 9 (20.00%) aditivnih i 23 (51.11%) antagonističkih interakcija.



Slika 21. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {*T. pulegioides* ulje-hloramfenikol (^{1*}); *T. pulegioides* ulje-tetraciklin (^{2*}); *T. pulegioides* ulje-streptomicin (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

U cilju određivanja slične antibakterijske aktivnosti, izvršena je hemometrijska PCA i HCA analiza (Ilić et al., 2014; Miladinović et al., 2014; Miladinović et al., 2013). PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema *T. pulegioides* ulje-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 81.80% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 12.31% (Slika 21A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 21B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema *T. pulegioides* ulje-antibiotici (Slika 21C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.88 (Slika 21D), HCA analiza je

identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije *T. pulegioides* ulje-streptomycin, pokazivala je snažan antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijske sojeve. Grupa B, takođe kombinacija ulje-streptomycin, ispoljavala je antagonizma prema bakteriji *S. aureus* ATCC 29213 za niske vrednosti FIC_A indeksa (Slika 21B, C). Vrednosti ($FIC_A \geq 0.40$), karakterisala su se sinergističkim i aditivnim delovanjem u odnosu na ovu bakteriju. Grupa C, dominantnog sinergističkog i aditivnog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija ulja, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.16 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (C_1 i C_2). U podgrupi C_1 ispitane kombinacije pokazivale su dominantan aditivan efekat, dok se podgrupa C_2 karakterisala dominantnim sinergizmom.

4.6.4. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

T. glabrescens ulje-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između ispitanog ulja i antibiotika dati su u Tabeli 23. Na osnovu 135 ispitanih kombinacija između etarskog ulja *T. glabrescens* i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 58 (42.96%) su pokazale sinergističko delovanje, 37 (27.41%) aditivno dejstvo dok 40 (29.63%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje. Najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom ispitanog etarskog ulja sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 55.56%. Najviši procenat aditivnog dejstva (37.78%) zabeležen je u kombinaciji ulje-tetraciklin, dok je najviši procenat antagonizma (51.11%) zabeležen u interakciji ulja sa streptomycinom. Rezultati dominantnih interakcija su vrlo slični prethodno diskutovanim rezultatima etarskog ulja *T. pulegioides*. Za razliku od ulja *T. pulegioides*, najbolji rezultati kombinovane interakcije *T. glabrescens* ulja i antibiotika su postignuti na bakterijskom soju *K. pneumoniae* ATCC 700603. Na ovom soju, kombinacija ulje-antibiotik je pokazala 59.26% sinergističkih interakcija, 25.93% aditivnih interakcija i 14.81% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *P. mirabilis* ATCC 12453 (14.81%), *E. coli* ATCC 25922 (18.52%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (40.74%), *S. aureus* ATCC 29213 (59.26%). Na osnovu procenta antagonističkih interakcija u odnosu na bakterijski soj *S. aureus* ATCC 29213, vidimo da ulje *T. glabrescens* sa antibioticima, ima drugačiji efekat u odnosu na *T. pulegioides* ulje.

Na osnovu rezultata u Tabeli 23, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema ulje-hloramfenikol, 25 (55.56%) interakcija su sinergističke, 14 (31.11%) aditivne, dok 6 (13.33%) interakcija pokazuje antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema ulje

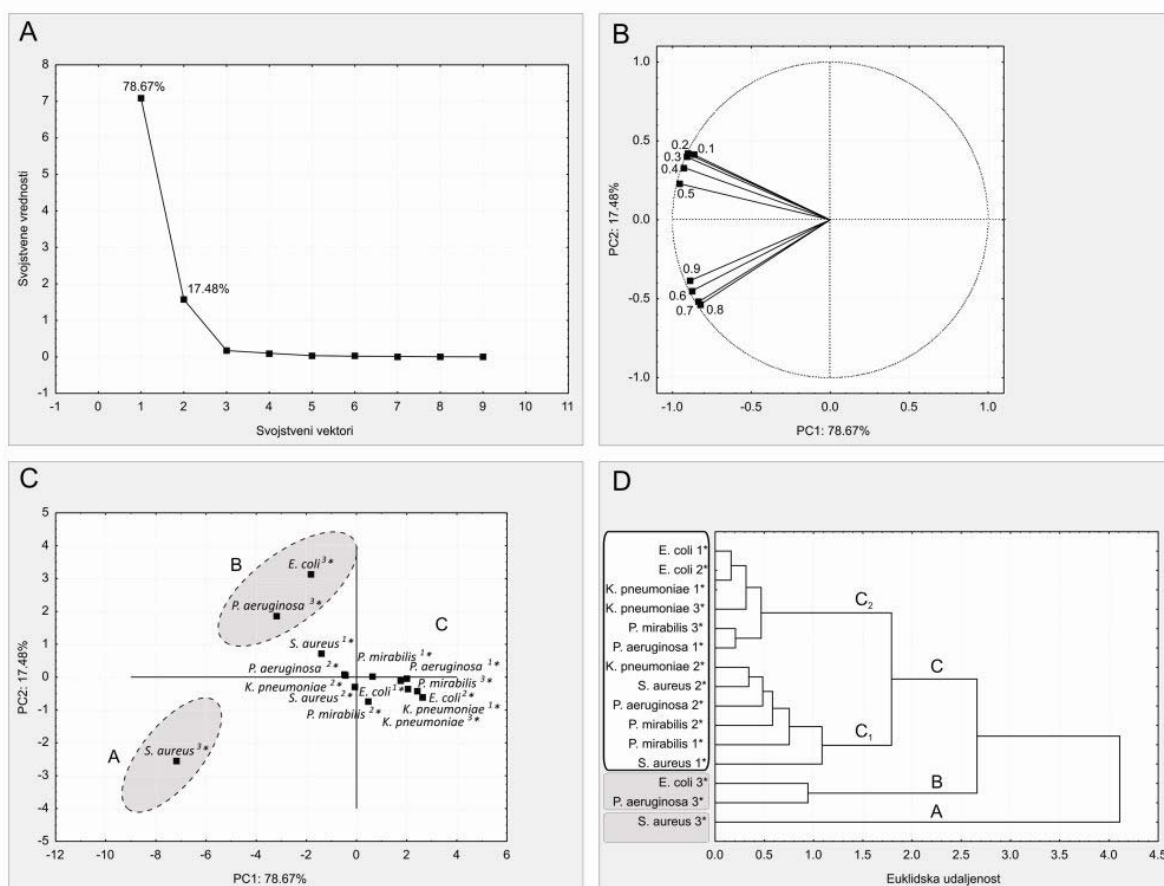
Tabela 23. Antibakterijska aktivnost sistema *T. glabrescens* ulje-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FIC _A indeksi <i>T. glabrescens</i> ulja									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1.09
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.32	0.44	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.66	1.70	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.80	0.95	1.10	1.10	1.08	1.21	1.16	1.47
	^{3*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.28
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.76	0.68	0.82	0.82	0.80	0.92	1.04	1.16	1.28
	^{2*}	0.43	0.56	0.69	0.96	0.95	1.08	1.04	1.16	1.66
	^{3*}	0.43	0.56	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.43	0.56	0.69	0.68	0.65	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.80	1.08	1.24	1.10	1.08	1.04	1.16	1.66
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	1.70	1.24	1.04	1.16	1.85
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.20	1.16	1.08	1.10	1.10	1.08	1.04	1.34	1.66
	^{2*}	0.65	0.68	0.82	0.96	1.10	1.24	1.04	1.16	1.47
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80

* Ispitani sistemi: ulje-hloramfenikol (^{1*}); ulje-tetraciklin (^{2*}); ulje-streptomycin (^{3*}).

tetraciklin su sledeći: 17 (37.78%) interakcija pokazuju sinergizam, 17 (37.78%) aditivno dejstvo, dok 11 (24.44%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem ulje-streptomycin, dao je 16 (35.56%) sinergističkih, 6 (13.33%) aditivnih i 23 (51.11%) antagonističkih interakcija.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema *T. glabrescens* ulje-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 78.67% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 17.48% (Slika 22A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 22B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema *T. glabrescens* ulje-antibiotici (Slika 22C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.66 (Slika 22D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije *T. glabrescens* ulje-streptomycin, pokazivala je snažan antagonizam u odnosu na *S. aureus* ATCC 29213. Grupa B, takođe kombinacija ulje-streptomycin, ispoljavala je antagonizam prema *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijskim sojevima. I pored dominantnog antagonizma, grupa B je za više FIC_A vrednosti (FIC_A ≥ 0.60) ispoljavala sve tri vrste ispitivanih interakcija (Slika 22B, C).



Slika 22. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema $\{T. glabrescens$ ulje-hloramfenikol (1*); $T. glabrescens$ ulje-tetraciklin (2*); $T. glabrescens$ ulje-streptomycin (3*) $\}$ zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Grupa C, grupa dominantnog sinergističkog i aditivnog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija ulja, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.79 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (C_1 i C_2). U podgrupi C_1 ispitane kombinacije pokazivale su dominantan aditivan efekat, dok se podgrupa C_2 karakterisala dominantnim sinergizmom. Rezultati hemometrijske analize kombinovane interakcije etarskog ulja $T. glabrescens$ sa antibioticima su vrlo slični rezultatima ulja $T. pulegioides$. Oba ulja u kombinaciji sa streptomycinom, pokazuju loše rezultate u pogledu antibakterijske aktivnosti na $E. coli$ ATCC 25922, $P. aeruginosa$ ATCC 27853 i $S. aureus$ ATCC 29213. Kombinacije ovih ulja sa ostalim antibioticima i svim ispitanim bakterijama pokazivali su dominantan sinergizam i aditivno dejstvo. Sinergističke interakcije kod oba timusa (podgrupe C_1)

uglavnom su ostvarivane hloramfenikolom, dok je aditivan efekat (podgrupe C2) ostvarivan tetraciklinom (Slike 21D, 22D).

4.6.5. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

S. kitaibelii ulje-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između ispitanog ulja i antibiotika dati su u Tabeli 24. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između etarskog ulja *S. kitaibelii* i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 72 (53.33%) su ispoljile sinergističko delovanje, 30 (22.22%) aditivno dejstvo dok 33 (24.44%) kombinacije su antagonističke.

Tabela 24. Antibakterijska aktivnost sistema *S. kitaibelii* ulje-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

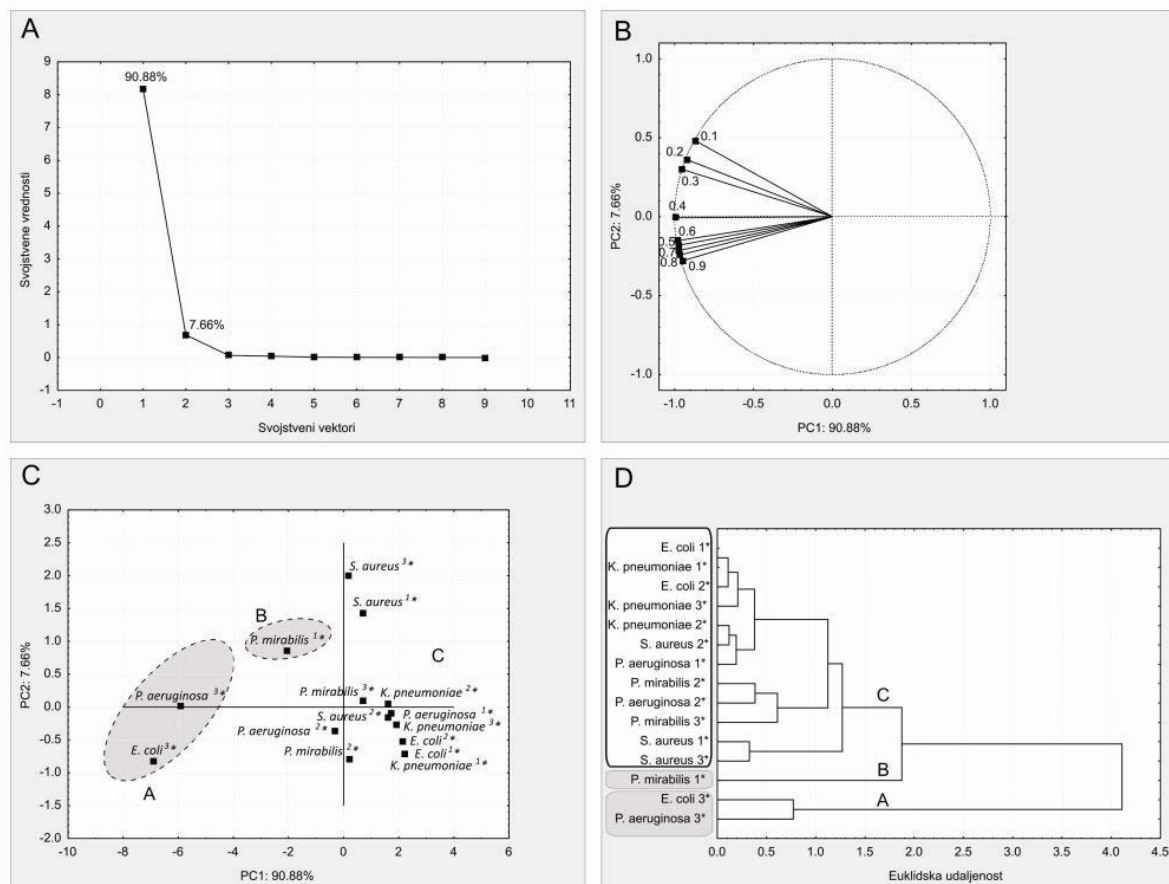
Bakterija		FIC _A indeksi <i>S. kitaibelii</i> ulja								
		0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.32	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.43	0.56	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	0.32	0.44	0.56	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.98	1.04	1.21	1.24	1.25	1.40	1.38	1.34	1.47
	^{2*}	0.43	0.56	0.69	0.82	0.95	0.92	1.21	1.34	1.66
	^{3*}	0.43	0.80	0.69	0.82	0.80	0.92	0.87	1.16	1.28
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.43	0.44	0.56	0.68	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.68	0.82	0.96	1.10	1.08	1.21	1.34	1.47
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.04	2.06	2.24	2.23
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.87	0.80	0.95	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.43	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	0.98	1.04	1.08	0.82	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09

* Ispitani sistemi: ulje-hloramfenikol (^{1*}); ulje-tetraciklin (^{2*}); ulje-streptomycin (^{3*}).

Najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti, za razliku od prethodno ispitanih timusa, su ostvareni kombinacijom ispitanog etarskog ulja sa tetraciklinom. Mada i kombinacija sa hloramfenikolom je dala veoma dobre rezultate. Ukupan procenat sinergističkih interakcija sistema ulje-tetraciklin iznosio je 62.22%. Najviši procenat aditivnog dejstva (24.44%) zabeležen je kod kombinacija ulje-tetraciklin i ulje-hloramfenikol, dok je najviši procenat antagonizma (44.44%) zabeležen u interakciji ulja sa streptomycinom. Visok procenat antagonističkih interakcija sa streptomycinom je karakteristika i predhodno opisanih etarskih ulja. Najbolji rezultati kombinovane interakcije ispitanog ulja i antibiotika su postignuti na

bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213. Na ovom soju, kombinacija ulje-antibiotik je pokazala 62.96% sinergističkih interakcija, 37.04% aditivnih interakcija, dok antagonizam nije zabeležen. Sličan efekat je pokazalo i etarsko ulje *T. pulegioides* u kombinaciji sa opisanim antibioticima, ali sa nešto višim udelom antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija sistema *S. kitaibelii* ulje-antibiotici, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (bez antagonizma), *E. coli* ATCC 25922 (33.33%), *P. mirabilis* ATCC 12453 (44.44%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (44.44%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 24, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema ulje-hloramfenikol, 27 (60.00%) interakcija su sinergističke, 11 (24.44%) aditivne, dok 7 (15.56%) interakcija pokazuju antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema ulje-tetraciklin su sledeći: 28 (62.22%) interakcija pokazuju sinergizam, 11 (24.44%) aditivno dejstvo, dok 6 (13.33%) interakcija pokazuju antagonizam.



Slika 23. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {*S. kitaibelii* ulje-hloramfenikol (^{1*}); *S. kitaibelii* ulje-tetraciklin (^{2*}); *S. kitaibelii* ulje-streptomycin (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Sistem ulje-streptomycin, dao je 17 (37.78%) sinergističkih, 8 (17.78%) aditivnih i 20 (44.44%) antagonističkih interakcija.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema *S. kitaibelii* ulje-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 90.88% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 7.66% (Slika 23A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 23B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema *S. kitaibelii* ulje-antibiotici (Slika 23C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.87 (Slika 23D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije *S. kitaibelii* ulje-streptomycin, pokazivala je izražen antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijske sojeve. Slično ponašanje, sa izraženim antagonizmom ka ovim bakterijama, pokazivalo je i prethodno diskutovano *T. pulegioides* etarsko ulje. Grupa B, kombinacija ulje-hloramfenikol, ispoljavala je nešto nižu vrednost antagonizma prema bakteriji *P. mirabilis* ATCC 12453 za vrednosti FIC_A ≥ 0.30 . Vrednosti (FIC_A ≤ 0.20), karakterisala su se aditivnim delovanjem u odnosu na ovu bakteriju (Slika 23B, C). Grupa C, dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija ulja, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija.

4.6.6. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

***N. nuda* ulje-antibiotik**

Rezultati odgovarajućih interakcija između ispitanog ulja i antibiotika dati su u Tabeli 25. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između etarskog ulja *N. nuda* i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 53 (39.26%) su pokazali sinergističko delovanje, 26 (19.26%) aditivno dejstvo dok 56 (41.48%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje. Na osnovu prethodno ispitanih etarskih ulja familije Lamiaceae, vidimo da se etarsko ulje *N. nuda* odlikuje znatno brojnijim antagonističkim interakcijama u odnosu na ispitane antibiotike.

Slično etarskim uljima timusa, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom ispitanog etarskog ulja sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 71.11%. Najviši procenat aditivnog dejstva (24.44%) zabeležen je u kombinaciji ulje-hloramfenikol, dok je najviši procenat antagonizma (62.22%) zabeležen u interakciji ulja sa tetraciklinom. Brojne antagonističke interakcije ulja sa tetraciklinom, odvaja etarsko ulje *N. nuda* od ulja ostalih Lamiaceae. Visok procenat sinergističkih interakcija (51.85%) ispitanih sistema, zapažen je na bakterijskim sojevima

Tabela 25. Antibakterijska aktivnost sistema *N. nuda* ulje-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

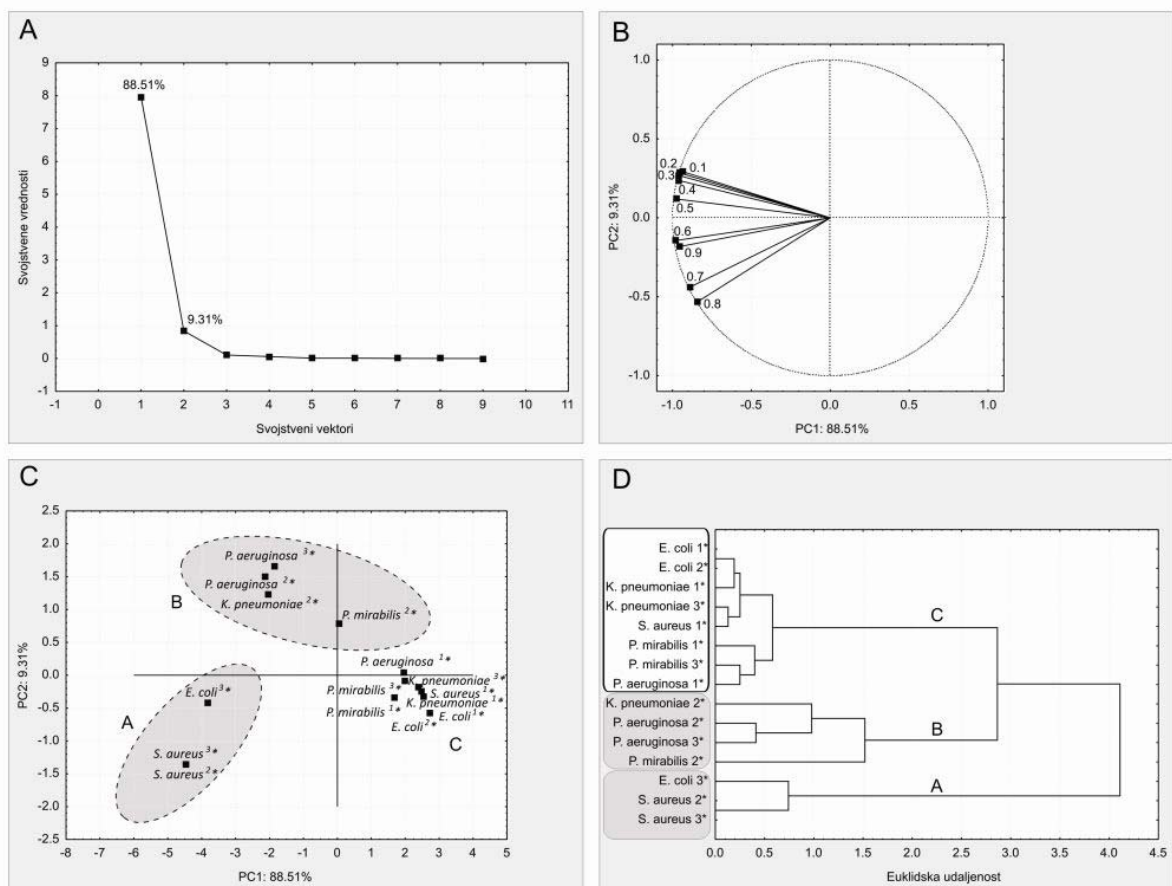
Bakterija	FIC _A indeksi <i>N. nuda</i> ulja									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.06	2.06	2.42
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.21	0.32	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.09	1.40	1.47	1.80	2.00	1.56	1.55	1.16	1.47
	^{3*}	0.32	0.44	0.43	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.43	0.56	0.69	0.68	0.80	0.92	1.04	1.16	1.28
	^{2*}	1.09	1.04	0.95	1.24	0.95	1.08	1.04	1.16	1.47
	^{3*}	0.43	0.44	0.69	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.43	0.56	0.69	0.68	0.80	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.20	1.40	1.60	1.80	1.70	1.56	1.04	1.16	2.23
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	1.70	1.40	1.04	1.16	1.85
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80

* Ispitani sistemi: ulje-hloramfenikol (^{1*}); ulje-tetraciklin (^{2*}); ulje-streptomycin (^{3*}).

E. coli ATCC 25922 i *K. pneumoniae* ATCC 700603. Međutim, najbolji rezultati kombinovane interakcije ispitanih ulja i antibiotika su postignuti na bakterijskom soju *P. mirabilis* ATCC 12453. Na ovom soju, kombinacija ulje-antibiotik je pokazala 44.44% sinergističkih interakcija, 37.04% aditivnih interakcija i 18.52% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (29.63%), *E. coli* ATCC 25922 (33.33%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (59.26%), *S. aureus* ATCC 29213 (66.67%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 25, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema ulje-hloramfenikol, 32 (71.11%) interakcije su sinergističke, 11 (24.44%) aditivne, dok 2 (4.44%) interakcije pokazuje antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema ulje-tetraciklin su sledeći: 7 (15.56%) interakcija pokazuju sinergizam, 10 (22.22%) aditivno dejstvo, dok 28 (62.22%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem ulje-streptomycin, dao je 14 (31.11%) sinergističkih, 5 (11.11%) aditivnih i 26 (57.78%) antagonističkih interakcija.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema *N. nuda* ulje-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni



Slika 24. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {*N. nuda* ulje-hloramfenikol (¹*); *N. nuda* ulje-tetraciklin (²*); *N. nuda* ulje-streptomycin (³*)} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

vektor objasnio je 88.51% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 9.31% (Slika 24A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 24B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema *N. nuda* ulje-antibiotici (Slika 24C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.99 (Slika 24D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena od kombinacija *N. nuda* ulje-streptomycin i *N. nuda* ulje-tetraciklin, pokazivala je snažan antagonizam za sve FIC_A vrednosti u odnosu na *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* ATCC 29213. Grupa B, takođe sastavljena od kombinacije ulje-streptomycin i ulje-tetraciklin, ispoljavala je antagonizam u odnosu na sojeve *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 12453 i *P. aeruginosa* ATCC 27853. Pojava aditivnog dejstva i nižih vrednosti antagonističkih interakcija za indekse FIC_A ≥ 0.60 , činilo je katrakteristiku ove grupe (Slika 24B, C). Grupa C,

dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija ulja, antibiotika i ispitanih bakterija. Najveći broj sinergističkih interakcija grupe C, je posledica kombinovane interakcije ulja sa hloramfenikolom (Slika 24C, D).

4.6.7. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

L. montana ulje-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između ispitanog ulja i antibiotika dati su u Tabeli 26. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između etarskog ulja *L. montana* i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 77 (57.04%) su pokazali sinergističko delovanje, 34 (25.19%) aditivno dejstvo dok 24 (17.78%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Tabela 26. Antibakterijska aktivnost sistema *L. montana* ulje-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

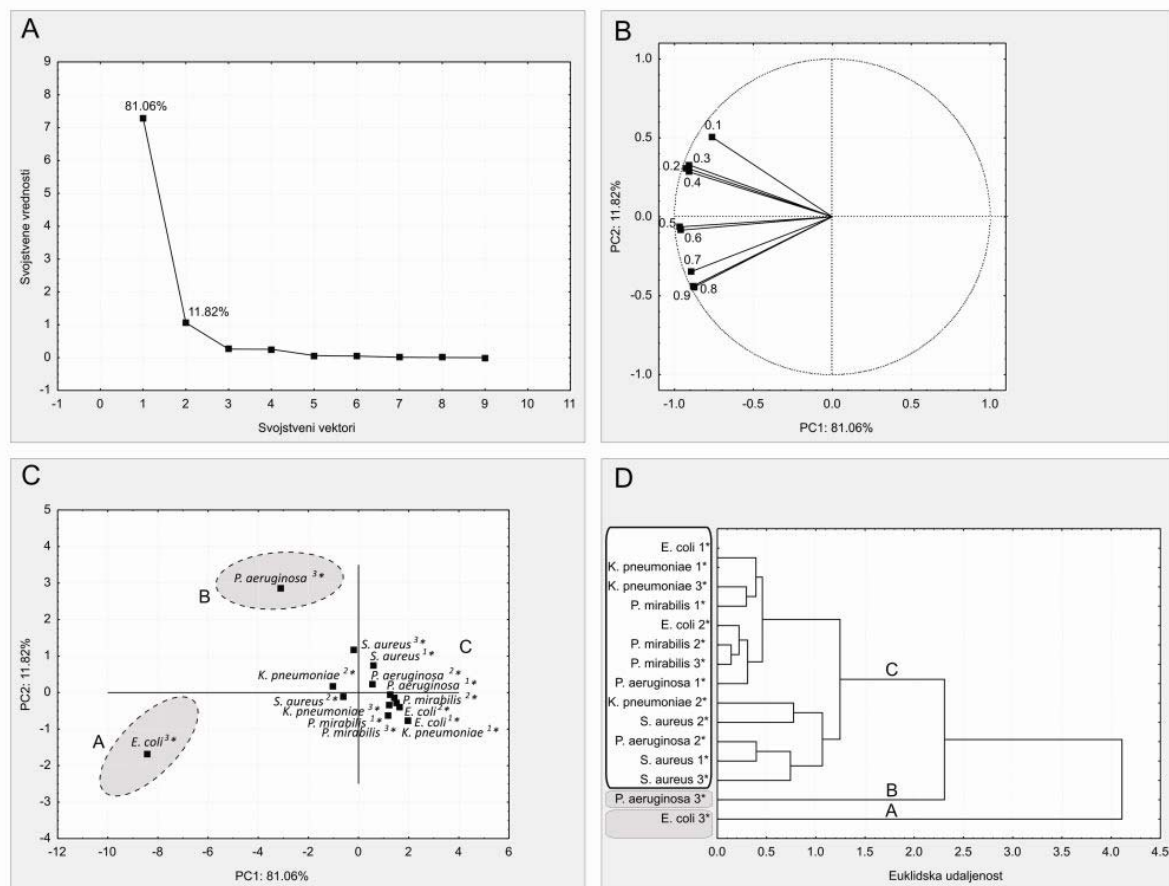
Bakterija		FIC _A indeksi <i>L. montana</i> ulja								
		0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.43	0.44	0.69	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.80	0.95	1.10	1.10	1.08	1.21	1.16	1.28
	^{3*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.80	0.92	0.87	0.98	1.09
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.32	0.56	0.43	0.54	0.80	0.92	0.87	0.98	1.28
	^{2*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	0.32	0.44	0.56	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.32	0.68	0.69	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.56	0.69	0.82	0.95	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.28	1.60	1.66	1.25	1.40	1.04	0.98	1.09
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.87	0.56	0.69	0.82	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.65	0.80	0.95	0.54	1.25	0.76	1.55	0.98	1.28
	^{3*}	1.20	0.80	0.69	0.82	0.80	0.92	0.87	0.98	1.28

* Ispitani sistemi: ulje-hloramfenikol (^{1*}); ulje-tetraciklin (^{2*}); ulje-streptomycin (^{3*}).

Slično etarskim uljima timusa i *N. nuda*, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom ispitanog etarskog ulja sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, slično *T. pulegioides* ulju, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 75.56%. Najviši procenat aditivnog dejstva (31.11%) zabeležen je u kombinaciji ulje-tetraciklin, dok je najviši procenat antagonizma (37.78%) zabeležen u interakciji ulja sa streptomycinom. Slično etarskom ulju *N. nuda*, najbolji rezultati kombinovane interakcije sa ispitanim antibioticima su postignuti na bakterijskom soju *P. mirabilis* ATCC 12453. Na ovom soju,

kombinacija ulje-antibiotik je pokazala 74.07% sinergističkih interakcija, 22.22% aditivnih interakcija i 3.70% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (11.11%), *S. aureus* ATCC 29213 (18.52%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (22.22%), *E. coli* ATCC 25922 (33.33%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 26, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema ulje-hloramfenikol, 34 (75.56%) interakcija su sinergističke, 10 (22.22%) aditivne, dok 1 (2.22%) interakcija pokazuje antagonizam. Rezultati interakcija *L. montana* ulja sa hloramfenikolom su identični rezultatima kombinovane interakcije hloramfenikola sa *T. pulegioides* uljem. Rezultati kombinovane interakcije sistema ulje-tetraciklin su sledeći: 25 (55.56%) interakcija pokazuju sinergizam, 14 (31.11%) aditivno dejstvo, dok 6 (13.33%) interakcija pokazuju antagonizam.



Slika 25. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {*L. montana* ulje-hloramfenikol (^{1*}); *L. montana* ulje-tetraciklin (^{2*}); *L. montana* ulje-streptomycin (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Sistem ulje-streptomycin, dao je 18 (40.00%) sinergističkih, 10 (22.22%) aditivnih i 17 (37.78%) antagonističkih interakcija.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema *L. montana* ulje-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 81.06% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 11.82% (Slika 25A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 25B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema *L. montana* ulje-antibiotici (Slika 25C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.31 (Slika 25D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije *L. montana* ulje-streptomycin, pokazivala je snažan antagonizam za sve FIC_A vrednosti u odnosu na *E. coli* ATCC 25922. Grupa B, takođe kombinacija ulje-streptomycin, ispoljavala je antagonizam prema bakteriji *P. aeruginosa* ATCC 27853 za niže vrednosti FIC_A indeksa (FIC_A ≤ 0.60). Vrednosti FIC_A ≥ 0.70 , karakterisala su se aditivnim delovanjem u odnosu na ovu bakteriju (Slika 25B, C). Grupa C, dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija ulja, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti, postignuti su kombinacijom ulje-hloramfenikol i ulje-tetraciklin na bakterijske sojeve tipa *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *P. mirabilis* ATCC 12453 (Slika 25C, D).

4.6.8. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

***P. longifolium* ulje-antibiotik**

Rezultati odgovarajućih interakcija između ispitano ulja i antibiotika dati su u Tabeli 27. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između etarskog ulja *P. longifolium* i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 50 (37.04%) su pokazali sinergističko delovanje, 29 (21.48%) aditivno dejstvo dok 56 (41.48%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje. Slično prethodno analiziranim uljima, izuzev ulja *S. kitaibelii*, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom *P. longifolium* ulja sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 66.67%. Najviši procenat aditivnog dejstva (26.67%) zabeležen je opet u kombinaciji sa hloramfenikolom, dok je najviši procenat antagonizma (77.78%) zabeležen u interakciji ulja sa tetraciklinom. Visok procenat antagonizma sa tetraciklinom, zabeležen je i kod diskutovanog ulja *N. nuda* (62.22%). Sva ostala, prethodno opisana ulja, najviši procenat antagonizma su ostvarivala u kombinaciji sa streptomycinom. Najbolji rezultati kombinovane interakcije *P. longifolium* ulja

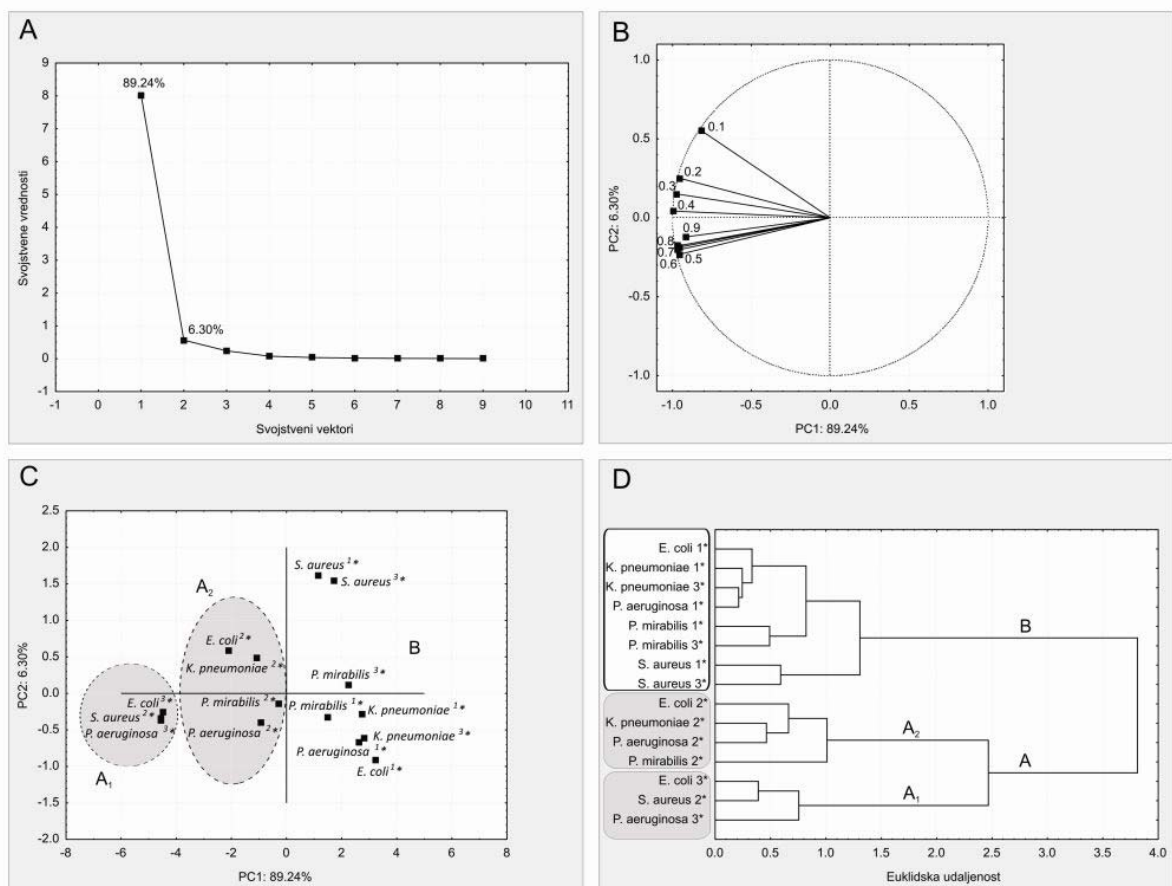
i antibiotika su postignuti na bakterijskom soju *K. pneumoniae* ATCC 700603. Sličnu aktivnost, pokazalo je već opisano *T. glabrescens* ulje. Na ovom soju, kombinacija *P. longifolium* ulje-antibiotik je pokazala 51.85% sinergističkih interakcija, 22.22% aditivnih interakcija i 25.93% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *P. mirabilis* ATCC 12453 (25.93%), *S. aureus* ATCC 29213 (37.04%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (55.56%), *E. coli* ATCC 25922 (62.96%).

Tabela 27. Antibakterijska aktivnost sistema *P. longifolium* ulje-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija		FIC _A indeksi <i>P. longifolium</i> ulja								
		0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.09	1.28	1.34	1.52	1.40	1.56	1.55	1.52	2.04
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.24	2.23
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.43	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.98	1.04	1.34	1.24	1.25	1.24	1.38	1.52	1.85
	^{3*}	0.32	0.44	0.56	0.54	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.54	0.68	0.69	0.82	0.95	1.08	1.04	1.16	1.28
	^{2*}	0.76	0.80	1.08	1.24	1.55	1.08	1.21	1.16	1.85
	^{3*}	0.54	0.68	0.69	0.68	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.80	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.92	1.08	1.24	1.40	1.40	1.38	1.52	2.04
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	1.85
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.20	0.68	0.69	0.82	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.06	2.24	2.42
	^{3*}	0.98	1.04	1.08	0.96	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09

* Ispitani sistemi: ulje-hloramfenikol (^{1*}); ulje-tetraciklin (^{2*}); ulje-streptomycin (^{3*}).

Na osnovu rezultata u Tabeli 27, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema ulje-hloramfenikol, 30 (66.67%) interakcija su sinergističke, 12 (26.67%) aditivne, dok 3 (6.67%) interakcije pokazuju antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema ulje-tetraciklin su sledeći: 3 (6.67%) interakcije pokazuju sinergizam, 7 (15.56%) aditivno dejstvo, dok 35 (77.78%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem ulje-streptomycin, dao je 17 (37.78%) sinergističkih, 10 (22.22%) aditivnih i 18 (40.00%) antagonističkih interakcija. Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema *P. longifolium* ulje-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1



Slika 26. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {*P. longifolium* ulje-hloramfenikol (¹*); *P. longifolium* ulje-tetraciklin (²*); *P. longifolium* ulje-streptomycin (³*)} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

svojstveni vektor objasnio je 89.24% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 6.30% (Slika 26A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 26B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema *P. longifolium* ulje-antibiotici (Slika 26C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 3.81 (Slika 26D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, sastavljena od kombinacija *P. longifolium* ulje-streptomycin i *P. longifolium* ulje-tetraciklin, pokazivala je dominantan antagonizam u odnosu na ispitane sojeve (Slika 26C, D). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.47 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (A₁ i A₂). U podgrupi A₁ ispitane kombinacije pokazivale su dominantan antagonizam za sve FIC_A vrednosti. Podgrupa A₂, sastavljena od kombinacije *P. longifolium* ulje-tetraciklin, pored dominantnog antagonizma, ispoljavala je pojavu sinergističkog i

aditivnog dejstva za vrednosti $FIC_A \leq 0.30$ (Slika 26B, D). Grupa B, grupa dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija ulja, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Najveći broj sinergističkih interakcija grupe B, je posledica kombinovane interakcije ulja sa hloramfenikolom (Slika 26C, D).

4.6.9. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

P. officinale ulje-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između ispitanih ulja i antibiotika dati su u Tabeli 28. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između etarskog ulja *P. officinale* i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 56 (41.48%) su pokazali sinergističko delovanje, 33 (24.44%) aditivno dejstvo dok 46 (34.07%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Tabela 28. Antibakterijska aktivnost sistema *P. officinale* ulje-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

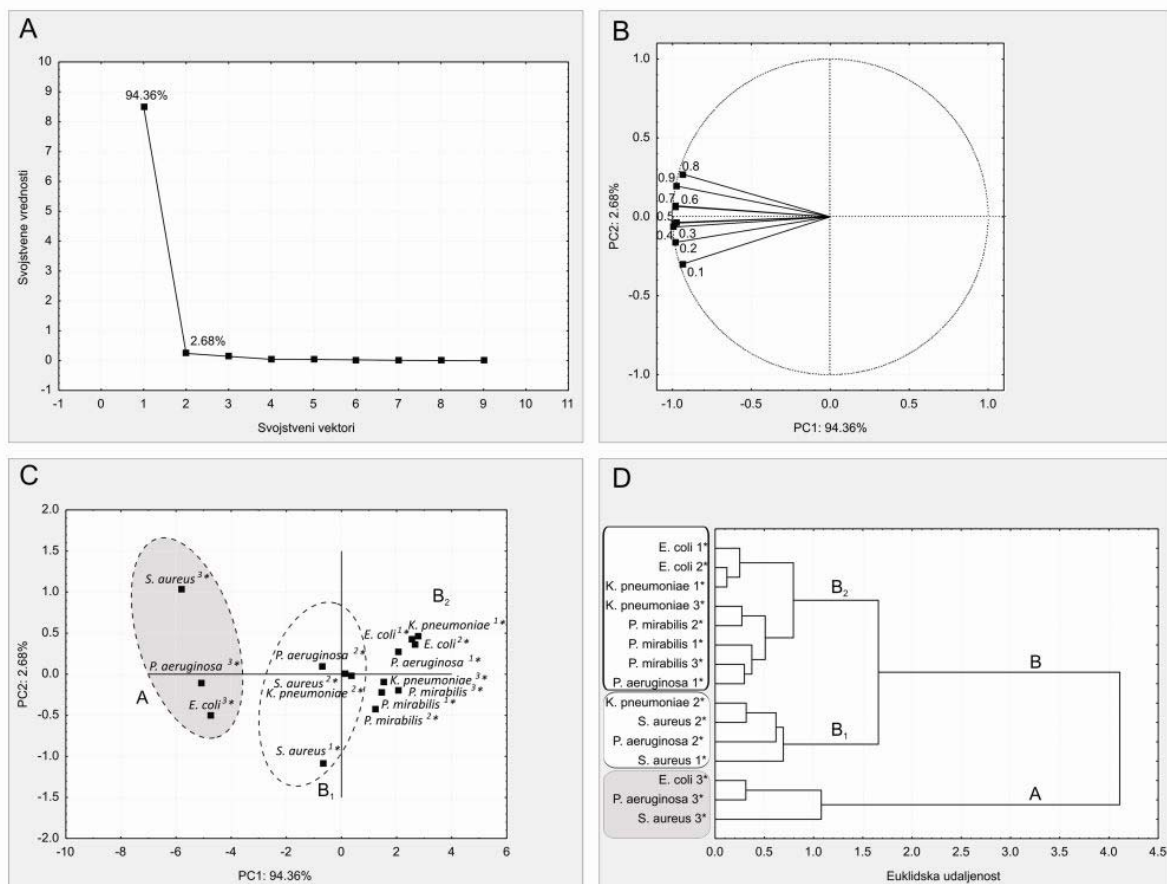
Bakterija	FIC_A indeksi <i>P. officinale</i> ulja									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.32	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.28
	^{2*}	0.21	0.44	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.23	1.70	2.23
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.68	0.82	0.96	0.95	1.08	1.21	1.34	1.66
	^{3*}	0.43	0.56	0.69	0.68	1.10	0.76	1.04	0.98	1.28
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.54	0.56	0.69	0.82	0.80	0.92	1.04	0.98	1.28
	^{2*}	0.65	0.56	0.69	0.68	1.10	0.92	1.04	0.98	1.28
	^{3*}	0.43	0.56	0.56	0.68	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.80	0.92	0.87	0.98	1.28
	^{2*}	0.65	0.80	1.08	1.24	1.25	1.24	1.21	1.34	1.85
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	1.88	2.42
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.09	1.04	0.95	1.10	1.10	1.08	1.21	1.34	1.47
	^{2*}	0.65	0.68	0.82	0.96	1.10	1.08	1.04	1.34	1.47
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80

* Ispitani sistemi: ulje-hloramfenikol (^{1*}); ulje-tetraciklin (^{2*}); ulje-streptomycin (^{3*}).

Slično prethodno analiziranim uljima, izuzev ulja *S. kitaibelii*, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom *P. officinale* ulja sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 55.56%. Najviši procenat aditivnog dejstva (31.11%) zabeležen je kod kombinacija ulje-hloramfenikol i ulje-tetraciklin, dok je najviši procenat antagonizma (62.22%) zabeležen u interakciji ulja sa

streptomycinom. Slično etarskom ulju *N. nuda* i *L. montana*, najbolji rezultati kombinovane interakcije sa ispitanim antibioticima su postignuti na bakterijskom soju *P. mirabilis* ATCC 12453. Na ovom soju, kombinacija ulje-antibiotik je pokazala 59.26% sinergističkih interakcija, 33.33% aditivnih interakcija i 7.41% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (14.81%), *E. coli* ATCC 25922 (37.04%), *S. aureus* ATCC 29213 (51.85%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (59.26%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 28, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema ulje-hloramfenikol, 25 (55.56%) interakcija su sinergističke, 14 (31.11%) aditivne, dok 6 (13.33%) interakcija pokazuju antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema ulje-tetraciklin su sledeći: 19 (42.22%) interakcija pokazuju sinergizam, 14 (31.11%) aditivno dejstvo, dok 12 (26.67%) interakcija pokazuju antagonizam.



Slika 27. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {*P. officinale* ulje-hloramfenikol (¹*); *P. officinale* ulje-tetraciklin (²*); *P. officinale* ulje-streptomycin (³*)} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujuću PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Sistem ulje-streptomycin, dao je 12 (26.67%) sinergističkih, 5 (11.11%) aditivnih i 28 (62.22%) antagonističkih interakcija.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema *P. officinale* ulje-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 94.36% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 2.66% (Slika 27A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 27B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema *P. officinale* ulje-antibiotici (Slika 27C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 4.08 (Slika 27D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije *P. officinale* ulje-streptomycin, pokazivala je snažan antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *S. aureus* ATCC 29213 bakterijske sojeve. Slični rezultati antagonizma sa streptomycinom, pokazani su kod ranije diskutovanog *T. glabrescens* etarskog ulja. Grupa B, dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija ulja, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.63 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (B₁ i B₂). U podgrupi B₁ ispitane kombinacije pokazivale su dominantan aditivan efekat, dok se podgrupa B₂ karakterisala dominantnim sinergizmom. Najveći broj sinergističkih interakcija grupe B, je posledica kombinovane interakcije ulja sa hloramfenikolom, dok su aditivne interakcije karakteristične za tetraciklin (Slika 27C, D).

4.6.10. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

***I. graveolens* ulje-antibiotik**

Rezultati odgovarajućih interakcija između ispitanog ulja i antibiotika dati su u Tabeli 29. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između etarskog ulja *I. graveolens* i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 57 (42.22%) su pokazali sinergističko delovanje, 42 (31.11%) aditivno dejstvo dok 36 (26.67%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje. Slično prethodno analiziranim uljima, izuzev ulja *S. kitaibelii*, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom *I. graveolens* ulja sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 60.00%. Najviši procenat aditivnog dejstva (44.44%) zabeležen je u kombinaciji ulje-tetraciklin, dok je najviši procenat antagonizma (55.56%) zabeležen u interakciji ulja sa streptomycinom. Slično etarskom ulju *N. nuda*, *L. montana* i *P. officinale*, najbolji rezultati kombinovane interakcije sa ispitanim antibioticima su postignuti na bakterijskom soju *P. mirabilis* ATCC 12453. Na

ovom soju, kombinacija ulje-antibiotik je pokazala 55.56% sinergističkih interakcija, 37.04% aditivnih interakcija i 7.41% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (11.11%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (29.63%), *E. coli* ATCC 25922 (40.74%), *S. aureus* ATCC 29213 (44.44%).

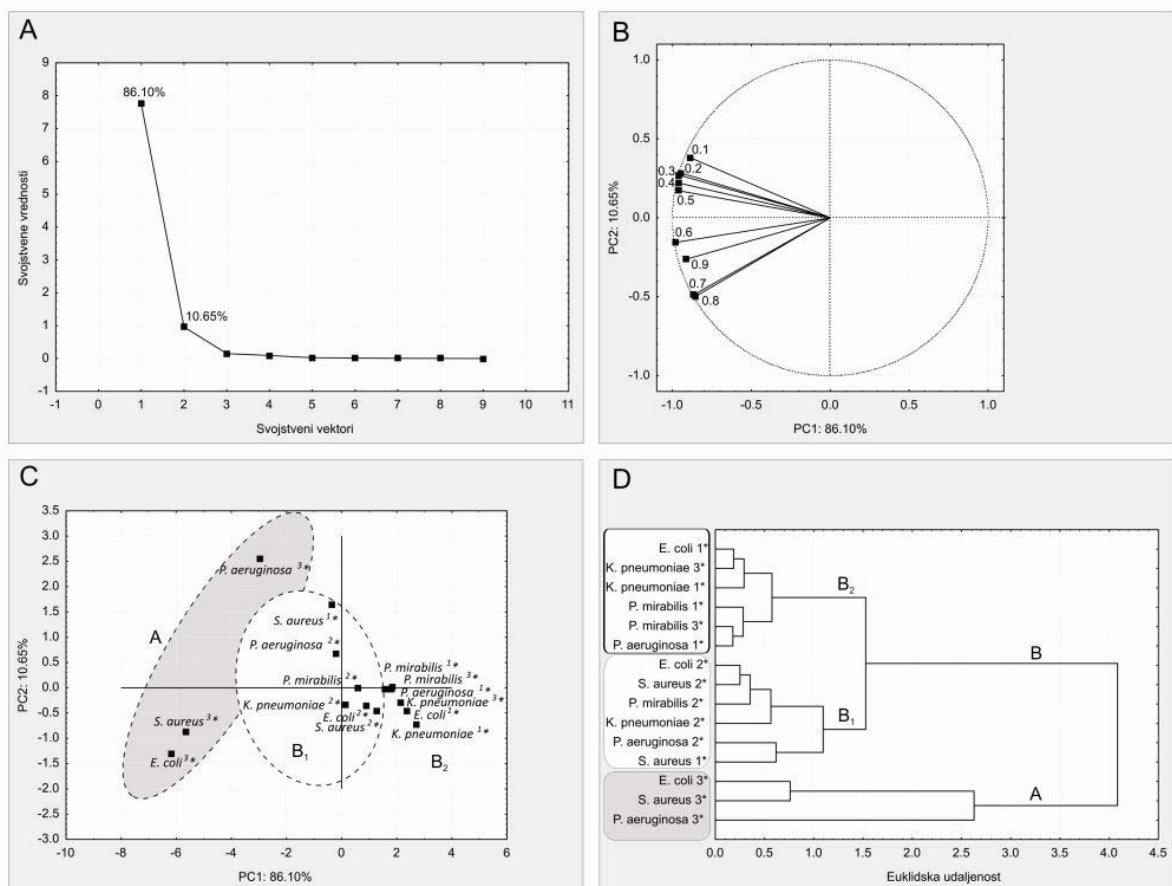
Tabela 29. Antibakterijska aktivnost sistema *I. graveolens* ulje-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FIC _A indeksi <i>I. graveolens</i> ulja									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.68	0.69	0.82	0.95	0.92	1.04	1.16	1.47
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.32	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.65	0.92	0.82	0.82	0.95	1.08	1.21	1.34	1.47
	^{3*}	0.43	0.44	0.56	0.68	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.43	0.56	0.69	0.82	0.95	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.65	0.68	0.82	0.96	0.95	1.08	1.04	1.16	1.28
	^{3*}	0.54	0.56	0.69	0.68	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.43	0.56	0.69	0.82	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.92	1.08	1.10	1.10	1.08	1.04	0.98	1.47
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	1.40	0.87	0.98	1.66
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.20	1.04	1.08	1.10	1.10	1.08	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.43	0.56	0.69	0.82	0.95	0.92	1.04	1.16	1.28
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.04

* Ispitani sistemi: ulje-hloramfenikol (^{1*}); ulje-tetraciklin (^{2*}); ulje-streptomycin (^{3*}).

Na osnovu rezultata u Tabeli 29, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema ulje-hloramfenikol, 27 (60.00%) interakcija su sinergističke, 17 (37.78%) aditivne, dok 1 (2.22%) interakcija pokazuje antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema ulje-tetraciklin su sledeći: 15 (33.33%) interakcija pokazuju sinergizam, 20 (44.44%) aditivno dejstvo, dok 10 (22.22%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem ulje-streptomycin, dao je 15 (33.33%) sinergističkih, 5 (11.11%) aditivnih i 25 (55.56%) antagonističkih interakcija.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema *I. graveolens* ulje-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 86.10% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 10.65% (Slika 28A).



Slika 28. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema $\{I. graveolens$ ulje-hloramfenikol (¹*); $I. graveolens$ ulje-tetraciklin (²*); $I. graveolens$ ulje-streptomycin (³*)} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 28B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema $I. graveolens$ ulje-antibiotici (Slika 28C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 4.08 (Slika 28D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije $I. graveolens$ ulje-streptomycin, pokazivala je dominantan antagonizam u odnosu na $E. coli$ ATCC 25922, $P. aeruginosa$ ATCC 27853 i $S. aureus$ ATCC 29213 bakterijske sojeve. Slični rezultati antagonizma sa streptomycinom, pokazani su kod ranije diskutovanih $T. glabrescens$ i $P. officinale$ ulja. U okviru grupe A, za vrednosti FIC_A ≥ 0.60 , uočena je niža vrednost antagonizma i sinergističko dejstvo kombinacije na $P. aeruginosa$ ATCC 27853 soj (Slika 28B, D). Grupa B, dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija ulja, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj

ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.53 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (B_1 i B_2). U podgrupi B_1 ispitane kombinacije pokazivale su dominantan aditivan efekat, dok se podgrupa B_2 karakterisala dominantnim sinergizmom. Najveći broj sinergističkih interakcija grupe B, je posledica kombinovane interakcije ulja sa hloramfenikolom, dok su aditivne interakcije karakteristične za tetraciklin (Slika 28C, D).

4.6.11. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema geraniol-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između geraniola i antibiotika dati su u Tabeli 30. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između geraniola i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 50 (37.04%) su pokazali sinergističko delovanje, 36 (26.67%) aditivno dejstvo dok 49 (36.30%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom geraniola sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 57.78%. Sličan efekat sa hloramfenikolom su pokazala i sva prethodno ispitana ulja, izuzev ulja *S. kitaibelii* u kojem je geraniol sa 50.43% zastupljenosti činio glavnu komponentu. Visok procenat aditivnog dejstva (33.33%) zabeležen je u kombinaciji geraniol-hloramfenikol, dok je najviši procenat antagonizma (64.44%) zabeležen u interakciji geraniola sa streptomycinom. Najbolji rezultati kombinovane interakcije geraniola i antibiotika su postignuti na bakterijskom soju *P. mirabilis* ATCC 12453. Interesantno je napomenuti, da su ulja sa visokim sadržajem geraniola (*T. pulegioides*, *S. kitaibelii* i *T. glabrescens*) najbolje rezultate kombinovane interakcije pokazivala na sojevima *S. aureus* ATCC 29213 i *K. pneumoniae* ATCC 700603. Na soju *P. mirabilis* ATCC 12453, kombinacija geraniol-antibiotik je pokazala 48.15% sinergističkih interakcija, 48.15% aditivnih interakcija i 3.70% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (25.93%), *E. coli* ATCC 25922 (37.04%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (48.15%), *S. aureus* ATCC 29213 (66.67%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 30, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema geraniol-hloramfenikol, 26 (57.78%) interakcija su sinergističke, 15 (33.33%) aditivne, dok 4 (8.89%) interakcije pokazuju antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema geraniol-tetraciklin su sledeći: 15 (33.33%) interakcija pokazuju sinergizam, 14 (31.11%) aditivno dejstvo, dok 16 (35.56%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem geraniol-streptomycin, dao je 9 (20.00%) sinergističkih, 7 (15.56%) aditivnih i 29 (64.44%) antagonističkih interakcija.

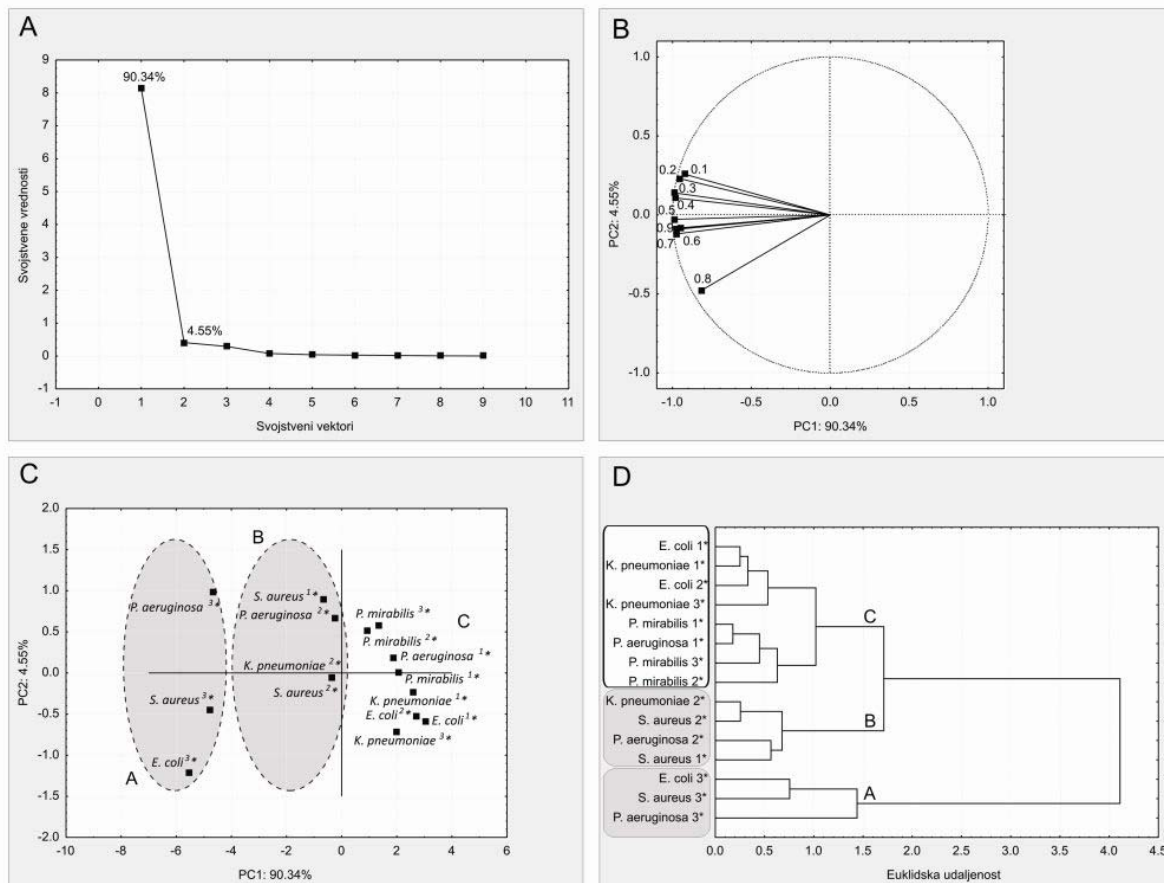
Tabela 30. Antibakterijska aktivnost sistema geraniol-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FIC _A indeksi geraniola									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.32	0.32	0.43	0.54	0.80	0.76	0.87	0.98	1.28
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.80	0.95	1.10	1.25	1.24	1.38	1.34	1.66
	^{3*}	0.32	0.44	0.56	0.68	0.80	1.08	1.04	1.16	1.28
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.43	0.56	0.69	0.68	0.80	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.65	0.80	0.82	0.96	0.95	0.92	1.04	0.98	1.47
	^{3*}	0.54	0.92	0.82	0.82	0.95	0.92	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.54	0.56	0.69	0.82	0.80	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.92	1.08	1.38	1.10	1.08	1.21	1.16	1.47
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	1.16	2.80
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.20	1.04	1.08	1.10	1.10	1.08	1.21	1.34	1.47
	^{2*}	0.76	0.80	0.95	1.10	1.25	1.24	1.21	1.34	1.85
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.06	2.24	2.23

* Ispitani sistemi: geraniol-hloramfenikol (^{1*}); geraniol-tetraciklin (^{2*}); geraniol-streptomycin (^{3*}).

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema geraniol-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 90.34% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 4.55% (Slika 29A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 29B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema geraniol-antibiotici (Slika 29C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.71 (Slika 29D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije geraniol-streptomycin, pokazivala je izražen antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *S. aureus* ATCC 29213 bakterijske sojeve. Slični rezultati antagonizma sa streptomycinom, pokazani su kod ranije diskutovanih *T. glabrescens* i *P. officinale* ulja. Bitno je napomenuti, da sadržaj geraniola u ulju *T. glabrescens* iznosi 22.33%, dok prisustvo geraniola u ulju *P. officinale* nije zabeleženo. U grupi B, koja se pretežno odnosi na kombinaciju geraniol-tetraciklin, zabeležene su većim delom antagonističke interakcije, takođe, u manjem broju, su konstantovane aditivne i

sinergističke interakcije, sa vrednostima $FIC_A \leq 0.60$ (Slika 29B, D). Grupa C, grupa dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija geraniola, antibiotika i ispitanih bakterija. Najveći broj sinergističkih interakcija grupe C, je posledica kombinovane interakcije ulja sa hloramfenikolom (Slika 29C, D).



Slika 29. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {geraniol-hloramfenikol (^{1*}); geraniol-tetraciklin (^{2*}); geraniol-streptomycin (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

4.6.12. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema timol-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između timola i antibiotika dati su u Tabeli 31. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između timola i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 71 (52.59%) su pokazali sinergističko delovanje, 32 (23.70%) aditivno dejstvo dok 32 (23.70%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Slično geraniolu, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom timola sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 71.11%. Najviši procenat aditivnog dejstva (26.67%) zabeležen je u kombinaciji

Tabela 31. Antibakterijska aktivnost sistema timol-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

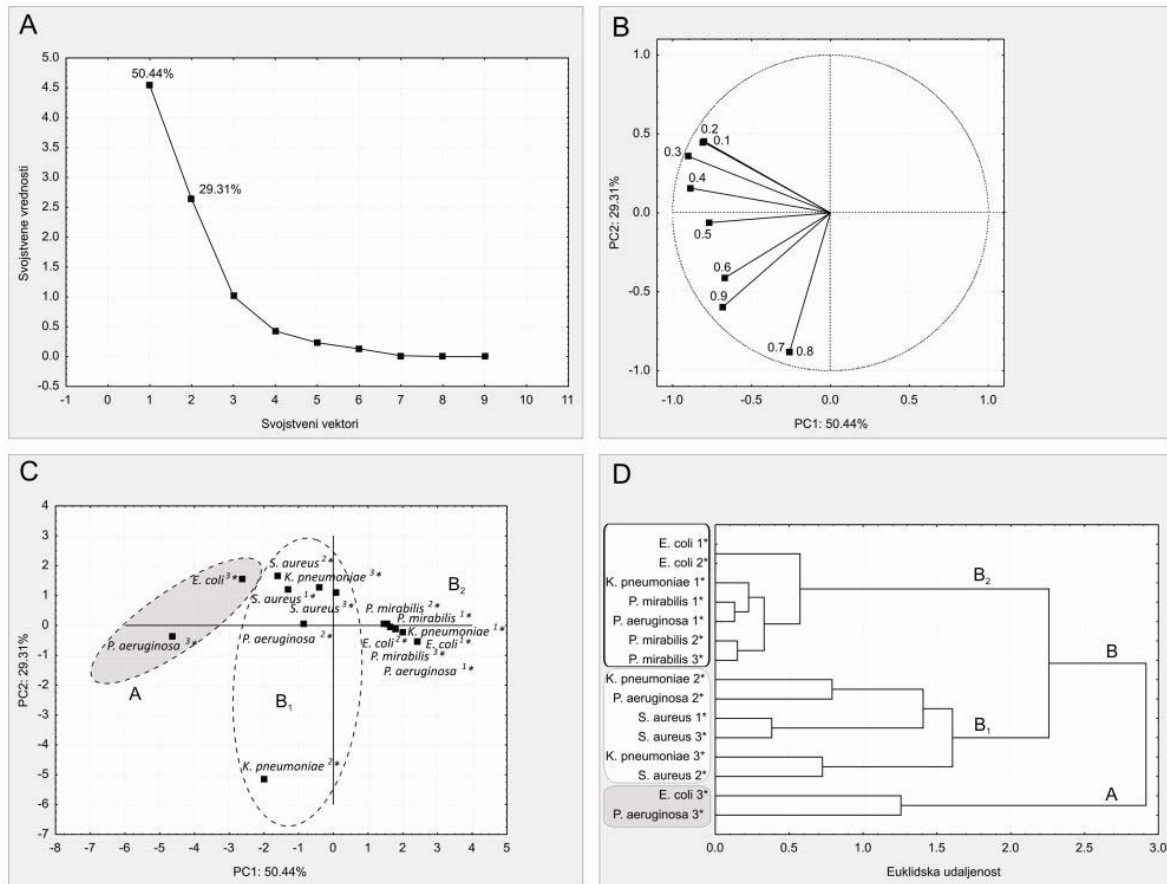
Bakterija	FIC _A indeksi timola									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.43	0.44	0.56	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.65	0.80	0.95	1.10	1.10	1.24	1.21	1.34	1.66
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.10	0.65	0.76	0.87	0.98	1.28
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.43	0.56	0.69	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.68	0.69	0.54	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	0.54	0.68	0.69	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.43	0.56	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.92	1.21	1.24	1.10	0.76	0.87	0.98	1.47
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	1.88	0.87	0.98	1.66
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.20	1.40	1.21	0.82	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.20	1.40	1.60	1.80	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	0.95	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09

* Ispitani sistemi: timol-hloramfenikol (^{1*}); timol-tetraciklin (^{2*}); timol-streptomycin (^{3*}).

timol-tetraciklin, dok je najviši procenat antagonizma (40.00%) zabeležen u interakciji timola sa streptomycinom. Slično geraniolu i pojedinim etarskim uljima, najbolji rezultati kombinovane interakcije timola i antibiotika su postignuti na bakterijskom soju *P. mirabilis* ATCC 12453. Interesantno je napomenuti, da su najbolji rezultati kombinovane interakcije *T. glabrescens* ulja (timol-13.79%) sa antibioticima ostvareni na soju *K. pneumoniae* ATCC 700603. Na soju *P. mirabilis* ATCC 12453, kombinacija timol-antibiotik je pokazala 77.78% sinergističkih interakcija, 22.22% aditivnih interakcija, dok antagonizam nije zabeležen. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *E. coli* ATCC 25922 (18.52%), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (29.63%), *S. aureus* ATCC 29213 (33.33%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (37.04%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 31, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema timol-hloramfenikol, 32 (71.11%) interakcije su sinergističke, 10 (22.22%) aditivne, dok 3 (6.67%) interakcije su antagonističke. Rezultati kombinovane interakcije sistema timol-tetraciklin su sledeći: 22 (48.89%) interakcije pokazuju sinergizam, 12 (26.67%) aditivno dejstvo, dok 11 (24.44%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem timol-streptomycin, dao

je 17 (37.78%) sinergističkih, 10 (22.22%) aditivnih i 18 (40.00%) antagonističkih interakcija.



Slika 30. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {timol-hloramfenikol (^{1*}); timol-tetraciklin (^{2*}); timol-streptomycin (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema timol-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 50.44% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 29.31% (Slika 30A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 30B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema timol-antibiotici (Slika 30C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.92 (Slika 30D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije timol-streptomycin, pokazala je dominantan antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922 i

P. aeruginosa ATCC 27853 bakterijske sojeve. U okviru ove grupe, za vrednosti $FIC_A \geq 0.60$, uočena je pojava aditivnog i sinergističkog dejstva (Slika 30B, C). Grupa B, grupa dominantnog sinergističkog i aditivnog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija timola, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.26 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (B_1 i B_2). U podgrupi B_1 ispitane kombinacije pokazivale su dominantan sinergistički i aditivan efekat, međutim, visok procenat antagonizma uočen je za $FIC_A \leq 0.40$ (Slika 30B, C). Ispitane kombinacije podgrupe B_2 , usled dominantnih interakcija timola sa hloramfenikolom, odlikovale su se snažnim sinergizmom (Slika 30D).

4.6.13. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema linalool-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između linaloola i antibiotika dati su u Tabeli 32. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između linaloola i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 62 (45.93%) su pokazali sinergističko delovanje, 35 (25.93%) aditivno dejstvo dok 38 (28.15%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Slično geraniolu i timolu, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom linaloola sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 57.78%. Najviši procenat aditivnog dejstva (31.11%) zabeležen je u kombinaciji linalool-tetraciklin, dok je najviši procenat antagonizma (42.22%) zabeležen u interakciji linaloola sa streptomycinom. Najbolji rezultati kombinovane interakcije linaloola i antibiotika su postignuti na bakterijskom soju *K. pneumoniae* ATCC 700603. Interesantno je napomenuti, da su ulja *T. glabrescens* (linalool-5.49%) i *P. longifolium* (linalool-0.56%) najbolje rezultate kombinovane interakcije pokazali u odnosu na *K. pneumoniae* ATCC 700603. Na ovom soju, kombinacija linalool-antibiotik je pokazala 55.56% sinergističkih interakcija, 33.33% aditivnih interakcija i 11.11% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *P. mirabilis* ATCC 12453 (25.93%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (29.63%), *S. aureus* ATCC 29213 (29.63%), *E. coli* ATCC 25922 (44.44%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 32, pokazano je da od 45 interakcija sistema linalool-hloramfenikol, 26 (57.78%) interakcija su sinergističke, 10 (22.22%) aditivne, dok 9 (20.00%) interakcija pokazuju antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema linalool-tetraciklin su sledeći: 21 (46.67%) interakcija pokazuje sinergizam, 14 (31.11%) aditivno dejstvo, dok 10 (22.22%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem linalool-streptomycin, dao je 15 (33.33%) sinergističkih, 11 (24.44%) aditivnih i 19 (42.22%) antagonističkih interakcija.

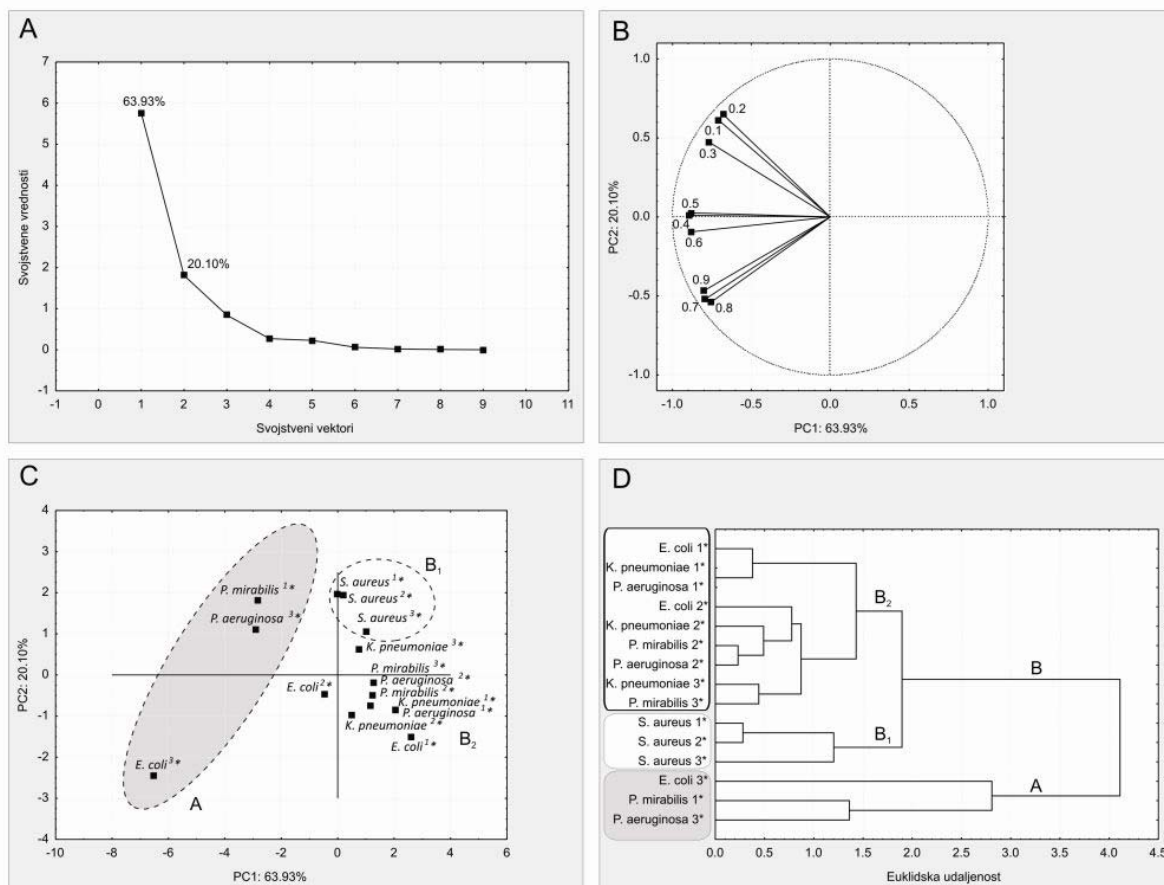
Tabela 32. Antibakterijska aktivnost sistema linalool-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FIC _A indeksi linaloola									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.87	0.92	0.95	1.10	0.95	1.08	1.21	1.16	1.66
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.43	0.56	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.65	0.68	0.82	0.82	0.95	0.92	1.04	1.16	1.66
	^{3*}	0.76	1.16	0.95	0.96	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.68	0.69	0.82	0.80	0.92	0.87	0.98	1.47
	^{3*}	0.54	0.80	0.82	0.96	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.43	0.56	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.68	0.82	0.82	0.80	0.92	0.87	0.98	1.28
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	1.24	1.04	0.98	2.04
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.20	1.40	1.60	0.82	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.20	1.40	1.60	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09

* Ispitani sistemi: linalool-hloramfenikol (^{1*}); linalool-tetraciklin (^{2*}); linalool-streptomycin (^{3*}).

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema linalool-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 63.93% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 20.10% (Slika 31A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 31B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju ispitivanih antibakterijskih interakcija sistema linalool-antibiotici (Slika 31C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 4.11 (Slika 31D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, sastavljena od kombinacija linalool-streptomycin i linalool-hloramfenikol, pokazivala je izražen antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 12453 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijske sojeve. U okviru ove grupe, kod oba antibiotika za vrednosti FIC_A ≥ 0.70 , uočena je pojava aditivnih i sinergističkih interakcija (Slika 31B, C). Grupa B, dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija linaloola, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.87 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (B₁ i B₂). U podgrupi B₁ ispitane kombinacije pokazivale su sinergistički i aditivan efekat, međutim,

visok procenat antagonizma uočen je za $FIC_A \leq 0.30$ (Slika 31B, C). Ispitane kombinacije podgrupe B₂, odlikovale su se dominantnim sinergističkim interakcijama. Najviši procenat antagonističkih interakcija ove grupe javio se na soju *E. coli* ATCC 25922 za $FIC_A \geq 0.70$ (Slika 31B, C).



Slika 31. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {linalool-hloramfenikol (^{1*}); linalool-tetraciklin (^{2*}); linalool-streptomycin (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

4.6.14. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema eukaliptol-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između eukaliptola i antibiotika dati su u Tabeli 33. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između eukaliptola i tri antibiotika (hloramfenikol, tetraciklin i streptomycin), 43 (31.85%) su pokazali sinergističko delovanje, 32 (23.70%) aditivno dejstvo dok 60 (44.44%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Slično prethodno ispitanim supstancama, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom eukaliptola sa hloramfenikolom. Za ovaj antibiotik, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 51.11%. Najviši procenat aditivnog dejstva (31.11%)

Tabela 33. Antibakterijska aktivnost sistema eukaliptol-antibiotik, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

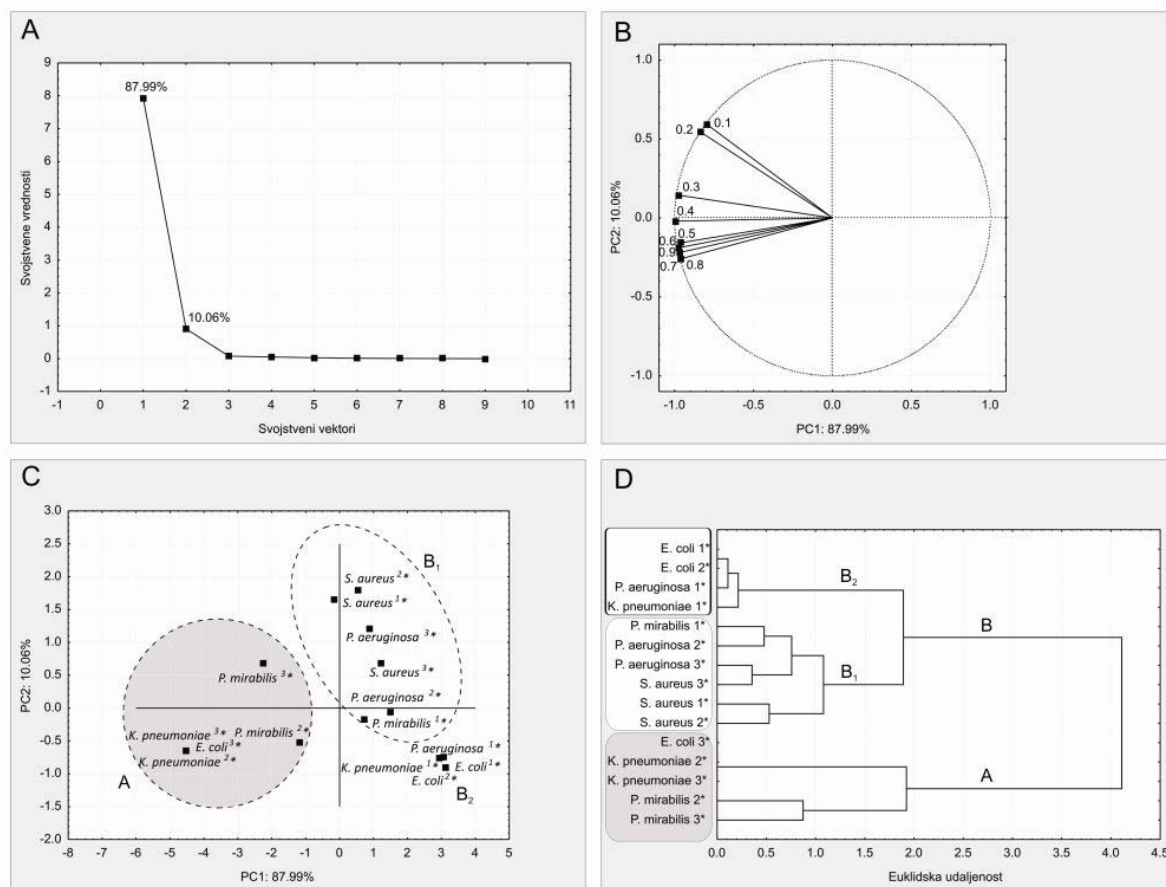
Bakterija	FIC _A indeksi eukaliptola									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1.09
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.21	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.21	0.44	0.43	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.65	0.80	0.95	0.96	1.10	1.08	1.21	1.34	1.47
	^{2*}	0.87	0.92	1.08	1.24	1.85	1.40	1.55	1.70	2.04
	^{3*}	1.20	1.40	1.47	1.52	1.55	1.72	1.55	1.70	2.04
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.32	0.32	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.65	0.68	0.82	0.82	0.80	0.92	1.04	1.16	1.47
	^{3*}	1.20	1.04	0.82	0.82	0.80	0.92	1.04	1.16	1.47
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.20	1.40	1.21	1.10	1.10	1.08	1.04	1.16	1.47
	^{2*}	1.20	1.40	0.95	0.96	0.95	0.92	1.04	1.16	1.09
	^{3*}	0.87	1.04	0.69	0.82	0.80	0.92	1.04	1.16	1.47

* Ispitani sistemi: eukaliptol-hloramfenikol (^{1*}); eukaliptol-tetraciklin (^{2*}); eukaliptol-streptomycin (^{3*}).

zabeležen je u kombinaciji eukaliptol-hloramfenikol, dok je najviši procenat antagonizma (71.11%) zabeležen u interakciji eukaliptola sa streptomycinom. Najbolji rezultati kombinovane interakcije eukaliptola i antibiotika su postignuti na bakterijskom soju *P. aeruginosa* ATCC 27853. Važno je istaći, da su najbolji rezultati kombinovane interakcije ulja *N. nuda* (eukaliptol-45.96%) i antibiotika postignuti na bakterijskom soju *P. mirabilis* ATCC 12453. Na soju *P. aeruginosa* ATCC 27853, kombinacija eukaliptol-antibiotik je pokazala 55.56% sinergističkih interakcija, 25.93% aditivnih interakcija i 18.52% antagonističkih interakcija. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *E. coli* ATCC 25922 (33.33%), *S. aureus* ATCC 29213 (37.04%), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (66.67%), *P. mirabilis* ATCC 12453 (66.67%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 33, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema eukaliptol-hloramfenikol, 23 (51.11%) interakcije su sinergističke, 14 (31.11%) aditivne, dok 8 (17.78%) interakcija pokazuje antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema eukaliptol-tetraciklin su sledeći: 13 (28.89%) interakcija pokazuju sinergizam, 12 (26.67%) aditivno dejstvo, dok 20 (44.44%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem eukaliptol-

streptomycin, dao je 7 (15.56%) sinergističkih, 6 (13.33%) aditivnih i 32 (71.11%) antagonističke interakcije.



Slika 32. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {eukaliptol-hloramfenikol (^{1*}); eukaliptol-tetraciklin (^{2*}); eukaliptol-streptomycin (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema eukaliptol-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 87.99% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 10.06% (Slika 32A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 32B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema eukaliptol-antibiotici (Slika 32C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 4.11 (Slika 32D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, sastavljena od kombinacija eukaliptol-streptomycin i eukaliptol-tetraciklin, pokazivala je izražen

antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *P. mirabilis* ATCC 12453 bakterijske sojeve. U okviru ove grupe, za soj *P. mirabilis* ATCC 12453, uočene su nešto niže vrednosti antagonizma, kao i pojava aditivnih i sinergističkih interakcija za $FIC_A \leq 0.30$ (Slika 32B, C). Grupa B, dominantnog sinergističkog i aditivnog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija eukaliptola, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.89 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (B_1 i B_2). U podgrupi B_1 ispitane kombinacije pokazivale su dominantan aditivan efekat, dok se podgrupa B_2 odlikovala dominantnim sinergizmom. Visok procenat antagonizma odvojio je podgrupu B_1 od podgrupe B_2 , gde pri svim FIC_A vrednostima, antagonizam nije detektovan (Slika 32B, C).

4.6.15. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

geranil acetat-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između geranil acetata i antibiotika dati su u Tabeli 34. Tabela 34. Antibakterijska aktivnost sistema geranil acetat-antibiotik, iskazana FIC_B i FC_A indeksima ispitanih supstanci.

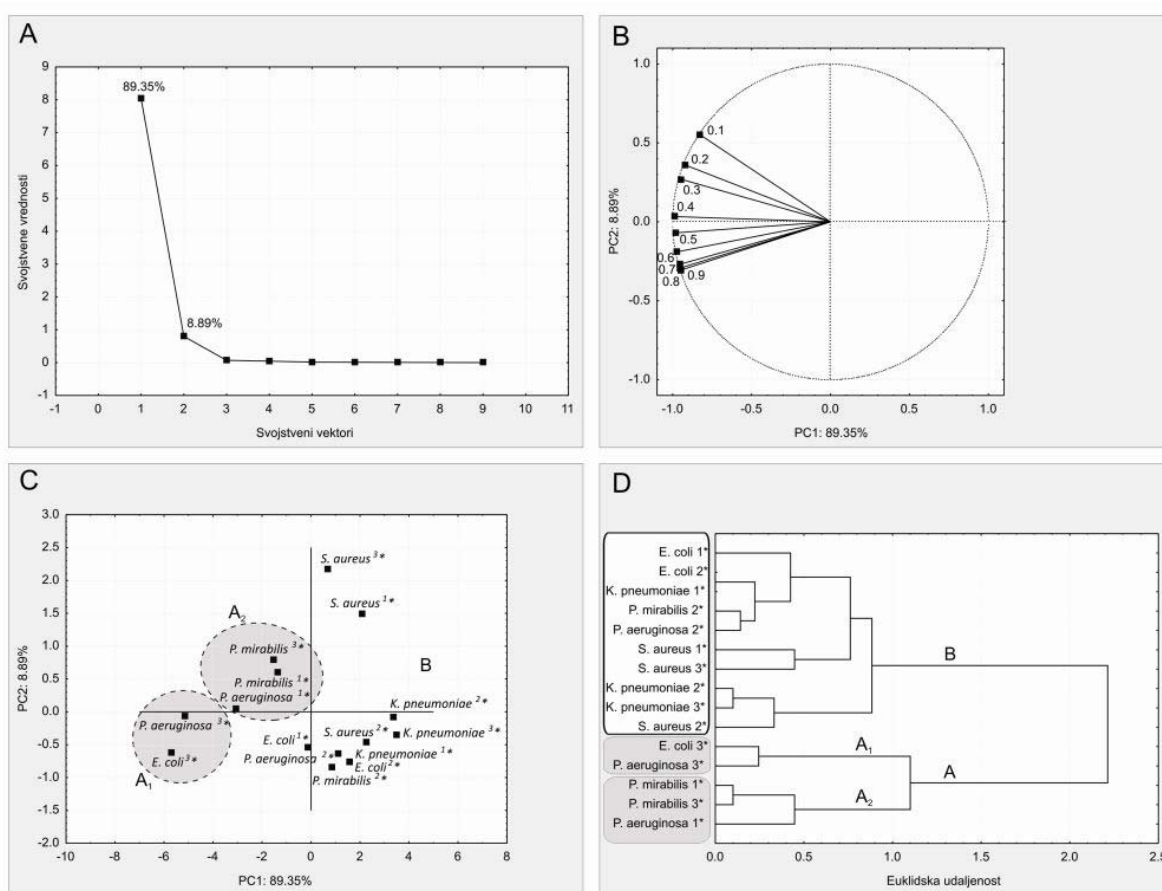
Bakterija	FC_A indeksi geranil acetata									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.50	0.50	0.50	0.50
	^{2*}	0.50	0.50	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.50	0.50	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
	^{2*}	0.50	0.40	0.30	0.30	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	^{3*}	0.40	0.40	0.30	0.30	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.90	0.80	0.70	0.70	0.60	0.60	0.60	0.50	0.50
	^{2*}	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.40	0.40
	^{3*}	0.90	0.90	0.70	0.70	0.60	0.60	0.60	0.50	0.50
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.90	0.90	0.80	0.80	0.80	0.80	0.70	0.70	0.70
	^{2*}	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.40	0.40	0.40	0.40
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.90	0.90	0.80
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.80	0.60	0.60	0.30	0.30	0.20	0.20	0.20	0.20
	^{2*}	0.50	0.40	0.40	0.40	0.40	0.30	0.30	0.30	0.30
	^{3*}	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50	0.30	0.20	0.20	0.20

* Ispitani sistemi: geranil acetat-hloramfenikol (^{1*}); geranil acetat-tetraciklin (^{2*}); geranil acetat-streptomycin (^{3*}).

Kako geranil acetat nije pokazao antibakterijsku aktivnost u odnosu na ispitane "checkerboard" sojeve, ovde ne možemo govoriti o sinergizmu, aditivnim interakcijama ili

antagonizmu, već govorimo o pojačanju aktivnosti antibiotika (Chou, 2010). Za sinergističke, aditivne i antagonističke interakcije, koje su obostrane za kombinovane supstance, neophodno je odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju. Pošto kombinovani geranil acetat nema inhibitornu koncentraciju, ovde možemo govoriti samo o uvećanju aktivnosti antibiotika, koja se izražava stepenom uvećanja, procentom ili u našem slučaju FIC_B indeksom antibiotika (Chou, 2010).

U cilju određivanja slične antibakterijske aktivnosti, izvršena je hemometrijska PCA i HCA analiza (Ilić et al., 2014; Miladinović et al., 2014; Miladinović et al., 2013). PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC_B i FC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema geranil acetat-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve.



Slika 33. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {geranil acetat-hloramfenikol (¹*); geranil acetat-tetraciklin (²*); geranil acetat-streptomycin (³*)} zasnovana na FIC_B vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 89.35% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 8.89% (Slika 33A). Dijagram odgovornih FC_A varijabli (Slika 33B), ilustruje uticaj FIC_B vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema geranil acetat-antibiotici (Slika 33C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.21 (Slika 33D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, sastavljena od kombinacija geranil acetat-streptomycin i geranil acetat-hloramfenikol, pokazala je indiferentan ili neznatan uticaj na uvećanje aktivnosti antibiotika u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 12453 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijske sojeve. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.11 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (A_1 i A_2). U podgrupi A_1 , izuzev vrednosti $FC_A \geq 0.70$, geranil acetat nije pojačao aktivnost streptomicina na ispitanim sojevima (Slika 33B, C). Ispitane kombinacije podgrupe A_2 , za sve FC_A vrednosti, odlikovale su se neznatnim uvećanjem aktivnosti antibiotika ($FIC_B \geq 0.50$), što je u najboljem slučaju iznosilo 2 puta. Grupa B, dominantnih vrednosti ($0.20 \leq FIC_B \leq 0.50$), sastojala se od svih ostalih kombinacija geranil acetata, antibiotika i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Ispitane kombinacije grupe B, sa dominantnim interakcijama geranil acetat-tetraciklin (Slika 33D), odlikovale su se uvećanjem aktivnosti antibiotika 2 do 5 puta. Na osnovu diskutovanih rezultata, vidimo da supstance koje nemaju antibakterijsku aktivnost, mogu uvećati aktivnost antibiotika. Ovo nam može pomoći u objašnjenju mehanizma antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i njihovih komponenata, kao i objašnjenju mehanizma njihovog kombinovanog dejstva sa antibioticima.

4.6.16. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema limonen-antibiotik

Rezultati odgovarajućih interakcija između limonena i antibiotika dati su u Tabeli 35. Kako limonen, slično geranil acetatu, nije pokazao antibakterijsku aktivnost u odnosu na ispitane "checkerboard" sojeve, ovde ne govorimo o sinergizmu ili antagonizmu, već o pojačanju aktivnosti antibiotika. Za sinergističke, aditivne i antagonističke interakcije, koje su obostrane za kombinovane supstance, neophodno je odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju. Pošto kombinovani limonen nema inhibitornu koncentraciju, ovde govorimo samo o uvećanju aktivnosti antibiotika, koja se izražava stepenom uvećanja, procentom ili FIC_B indeksom antibiotika (Chou, 2010).

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC_B i FC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema limonen-antibiotici u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 91.92% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio

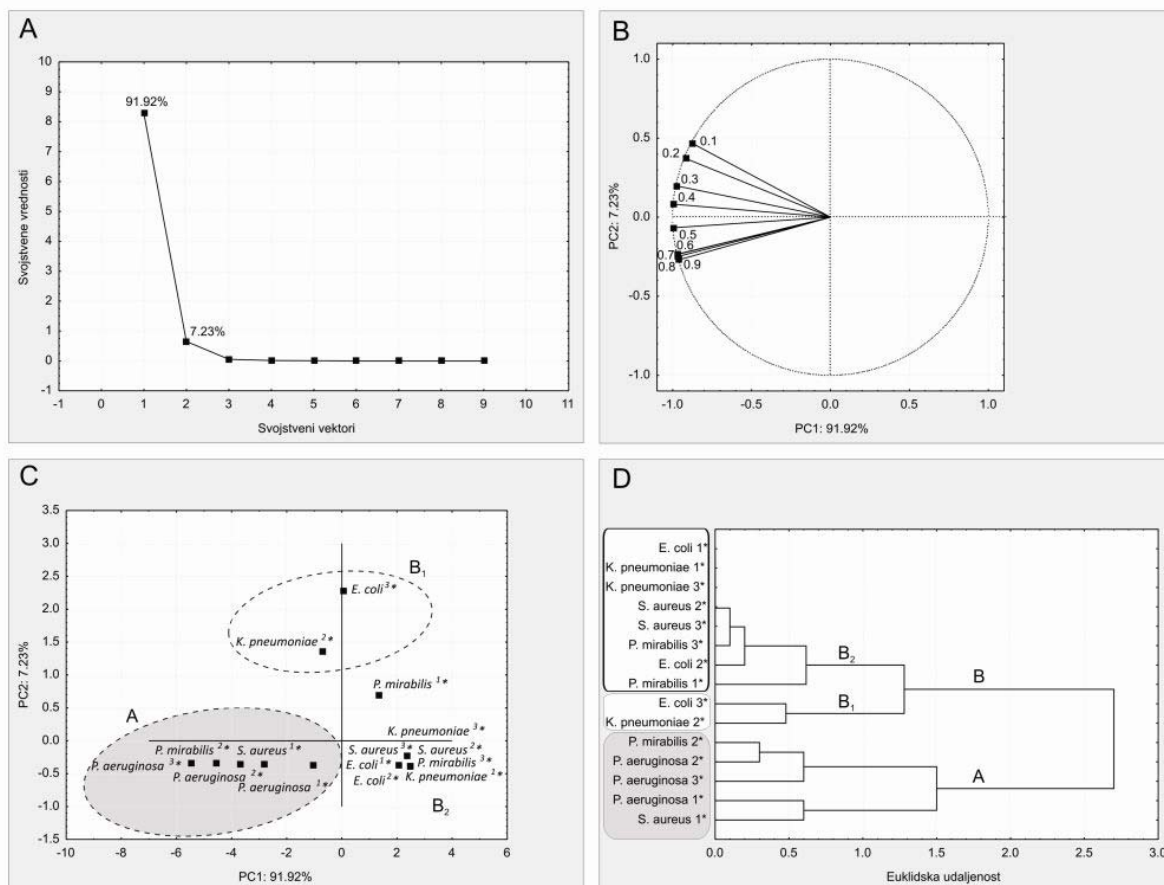
Tabela 35. Antibakterijska aktivnost sistema limonen-antibiotik, iskazana FIC_B i FC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FC_A indeksi limonena									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	^{2*}	0.20	0.10	0.10	0.20	0.10	0.20	0.10	0.20	0.10
	^{3*}	0.90	0.90	0.50	0.50	0.30	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	^{2*}	0.80	0.70	0.70	0.50	0.40	0.30	0.30	0.30	0.20
	^{3*}	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.60	0.20	0.40	0.20	0.20	0.20	0.10	0.10	0.10
	^{2*}	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
	^{3*}	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
	^{2*}	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
	^{2*}	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	^{3*}	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

* Ispitani sistemi: limonen-hloramfenikol (^{1*}); limonen-tetraciklin (^{2*}); limonen-streptomicin (^{3*}).

dotatnih 7.23% (Slika 34A). Dijagram odgovornih FC_A varijabli (Slika 34B), ilustruje uticaj FIC_B vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema limonen-antibiotici (Slika 34C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.70 (Slika 34D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, sastavljena od kombinacija limonen-antibiotici, pokazala je indiferentan ili neznatan uticaj na uvećanje aktivnosti antibiotika u odnosu na *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *S. aureus* ATCC 29213 bakterijske sojeve (Slika 34C, D). Ispitane kombinacije grupe A, za sve FC_A vrednosti, odlikovale su se neznatnim uvećanjem aktivnosti antibiotika ($FIC_B \geq 0.50$), što je u najboljem slučaju iznosilo 2 puta. Uticaj limonena na uvećanje antibakterijske aktivnosti streptomicina u ovoj grupi nije zabeležen. Grupa B, grupa dominantnih vrednosti ($FIC_B \leq 0.20$), sastojala se od svih ostalih kombinacija limonena, antibiotika i ispitanih bakterija (Slika 34C, D). Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.28 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (B_1 i B_2). U podgrupi B_1 , za vrednosti $FC_A \leq 0.40$, uočen je slabiji uticaj limonena na aktivnost antibiotika (Slika 34B, C). Ispitane kombinacije podgrupe B_2 , za sve FC_A vrednosti,

odlikovale su se znatnim uvećanjem aktivnosti antibiotika ($FIC_B \leq 0.20$), što je u najboljem slučaju iznosilo 10 puta. Svi ovi rezultati, kao što je već napomenuto, mogu nam pomoći u objašnjenju mehanizma antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i njihovih komponenata, kao i objašnjenju mehanizma njihovog kombinovanog dejstva sa antibioticima.



Slika 34. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {limonen-hloramfenikol (¹*); limonen-tetraciklin (²*); limonen-streptomycin (³*)} zasnovana na FIC_B vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

4.6.17. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema geraniol-monoterpenoid

Rezultati odgovarajućih interakcija između geraniola i pojedinih terpenoida ulja, dati su u Tabeli 36. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između geraniola i tri monoterpenoida (timol, linalool i eukaliptol), 34 (25.19%) su pokazali sinergističko delovanje, 58 (42.96%) aditivno dejstvo dok 43 (31.85%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom geraniola sa linaloolom. Za ovaj monoterpenoid, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je

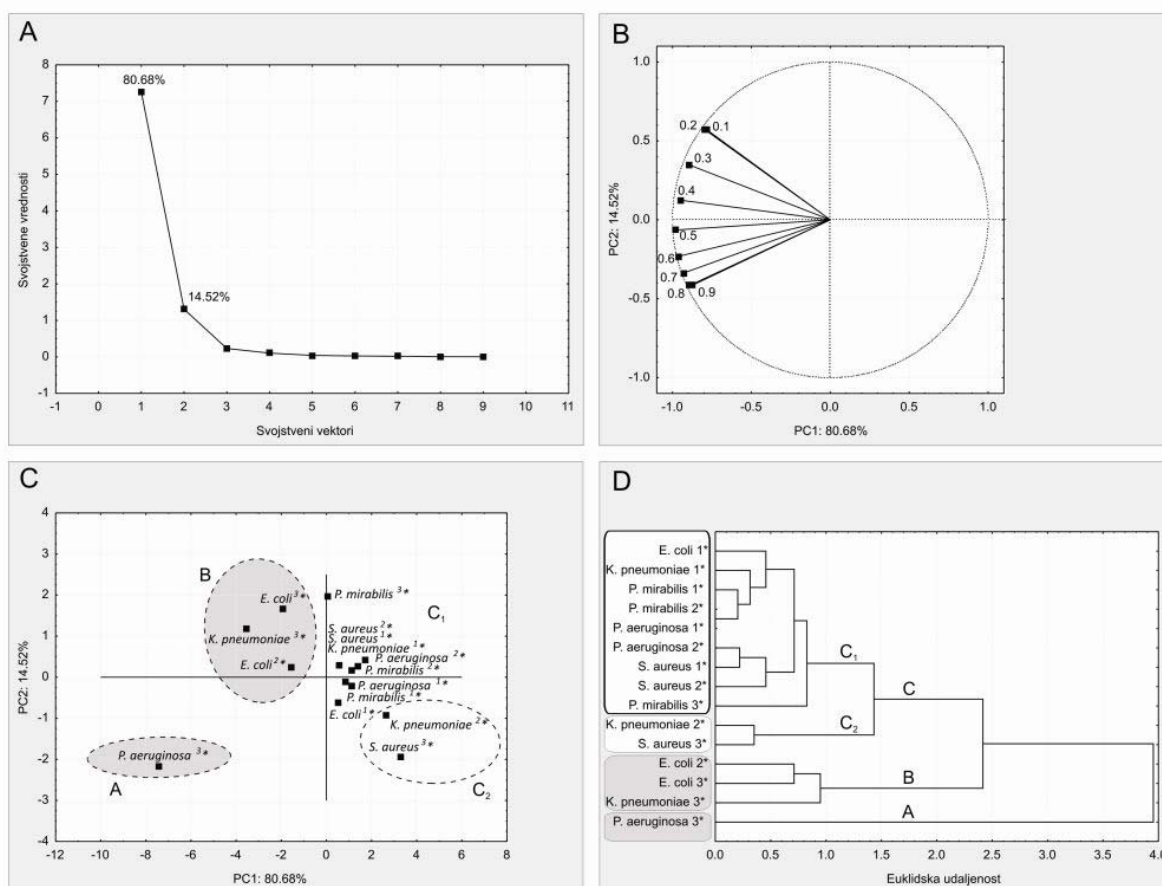
Tabela 36. Antibakterijska aktivnost sistema geraniol-monoterpenoid, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FIC _A indeksi geraniola									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.76	0.92	0.95	0.96	1.10	1.08	1.04	1.16	1.28
	^{2*}	1.20	1.16	1.08	1.24	1.25	1.24	1.21	1.34	1.66
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.24	1.25	1.24	1.21	1.16	1.28
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.98	1.04	0.95	0.96	0.95	0.92	0.87	0.98	1.47
	^{2*}	0.65	0.68	0.69	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	1.55	1.56	1.38	1.34	1.47
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.87	0.92	0.95	0.96	0.95	0.92	1.04	0.98	1.28
	^{2*}	0.76	0.92	0.95	0.96	0.95	0.92	0.87	0.98	1.28
	^{3*}	1.20	1.40	1.08	1.10	0.95	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.76	0.92	0.95	0.96	0.95	0.92	0.87	0.98	1.28
	^{2*}	0.87	0.92	0.95	0.96	0.95	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.87	0.92	0.95	0.96	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.87	1.04	0.95	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	0.43	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09

* Ispitani sistemi: geraniol-timol (^{1*}); geraniol-linalool (^{2*}); geraniol-eukaliptol (^{3*}).

35.56%. Najviši procenat aditivnog dejstva (68.89%) zabeležen je u kombinaciji geraniol-timol, dok je najviši procenat antagonizma (64.44%) zabeležen u interakciji geraniola sa eukaliptolom. Najbolji rezultati kombinovane interakcije geraniola i monoterpenoida su postignuti na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213. Na ovom soju, kombinacija geraniol-monoterpenoid je pokazala 59.26% sinergističkih interakcija, 40.74% aditivnih interakcija, dok antagonizam nije zabeležen. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *P. mirabilis* ATCC 12453 (14.81%), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (37.04%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (37.04%), *E. coli* ATCC 25922 (70.37%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 36, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema geraniol-timol, 9 (20.00%) interakcija su sinergističke, 31 (68.89%) aditivna, dok 5 (11.11%) interakcija pokazuju antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema geraniol-linalool su sledeći: 16 (35.56%) interakcija pokazuju sinergizam, 20 (44.44%) aditivno dejstvo, dok 9 (20.00%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem geraniol-eukaliptol, dao je 9 (20.00%) sinergističkih, 7 (15.56%) aditivnih i 29 (64.44%) antagonističkih interakcija.



Slika 35. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {geraniol-timol (^{1*}); geraniol-linalool (^{2*}); geraniol-eukaliptol (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

U cilju određivanja slične antibakterijske aktivnosti, izvršena je hemometrijska PCA i HCA analiza (Ilić et al., 2014; Miladinović et al., 2014; Miladinović et al., 2013). PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema geraniol-monoterpenoidi u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 80.68% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 14.52% (Slika 35A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 35B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema geraniol-monoterpenoidi (Slika 35C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.42 (Slika 35D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije geraniol-eukaliptol, pokazivala je snažan antagonizam u odnosu na *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijski soj. U grupi B, za vrednosti FIC_A ≥ 0.50 , kombinacije geraniol-eukaliptol i

geraniol-linalool pokazale su slab antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922 i *K. pneumoniae* ATCC 700603 sojeve (Slika 35B, C). Grupa C, grupa dominantnog aditivnog i sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija geraniola, monoterpenoida i ispitanih bakterija. Ova grupa, ujedno je sadržala i najveći broj ispitanih interakcija. Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.47 , HCA analiza je podelila ovu grupu na dve podgrupe (C_1 i C_2). U podgrupi C_1 ispitane kombinacije pokazivale su dominantan aditivan efekat, dok se podgrupa C_2 karakterisala dominantnim sinergizmom. Najveći broj aditivnih interakcija podgrupe C_1 , je posledica kombinovane interakcije geraniola sa timolom.

4.6.18. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema timol-monoterpenoid

Rezultati odgovarajućih interakcija između timola i pojedinih terpenoida ulja, dati su u Tabeli 37. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između timola i tri monoterpenoida (geraniol, linalool i eukaliptol), 41 (30.37%) su pokazali sinergističko delovanje, 60 (44.44%) aditivno dejstvo dok 34 (25.19%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Tabela 37. Antibakterijska aktivnost sistema timol-monoterpenoid, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FIC_A indeksi timola									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	1.20	1.04	1.08	0.96	0.95	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	1.20	1.16	1.21	1.24	1.10	1.08	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.34	1.38	1.25	1.24	1.04	0.98	1.09
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.87	0.92	0.95	0.96	0.95	1.08	1.04	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.80	0.82	0.82	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	1.55	1.56	1.38	1.34	1.47
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.98	0.92	0.95	0.96	0.95	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.92	0.95	0.96	0.95	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.38	1.25	1.08	0.87	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.87	0.92	0.95	0.96	0.95	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.87	0.80	0.82	0.82	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.76	0.80	0.95	0.96	0.95	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.87	1.04	0.82	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	0.43	0.44	0.56	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09

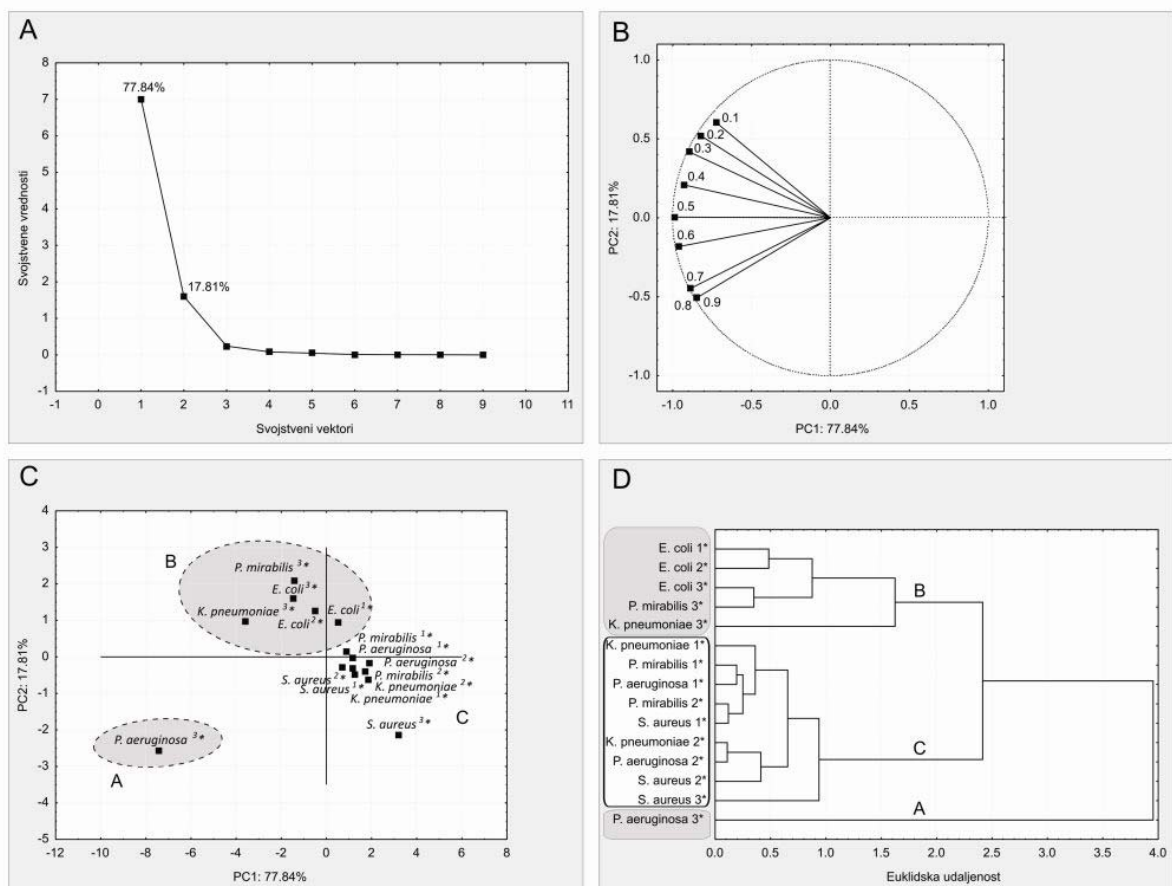
* Ispitani sistemi: timol-geraniol (^{1*}); timol-linalool (^{2*}); timol-eukaliptol (^{3*}).

Slično geraniolu, najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom timola sa linaloolom. Za ove terpenoide, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 51.11%. Najviši procenat aditivnog dejstva (75.56%) zabeležen je u kombinaciji timol-

geraniol, dok je najviši procenat antagonizma (64.44%) zabeležen u interakciji timola sa eukaliptolom. Slično geraniolu, najbolji rezultati kombinovane interakcije timola i monoterpenoida su postignuti na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213. Na ovom soju, kombinacija timol-monoterpenoid je pokazala 59.26% sinergističkih interakcija, 40.74% aditivnih interakcija, dok antagonizam nije zabeležen. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *P. mirabilis* ATCC 12453 (18.52%), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (33.33%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (33.33%), *E. coli* ATCC 25922 (40.74%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 37, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema timol-geraniol, 10 (22.22%) interakcija su sinergističke, 34 (75.56%) aditivne, dok 1 (2.22%) interakcija pokazuje antagonizam. Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima prethodno diskutovanog sistema geraniol-timol (Tabela 36), uočavamo da iste FIC_A vrednosti supstanci različito doprinose sinergizmu. Drugim rečima, u kombinaciji geraniol-timol, doprinos timola sinergizmu i aditivnom efektu, je izraženiji nego doprinos geraniola. Ovo se može objasniti na osnovu hidrofobnosti, lipofilnosti kao i log P vrednosti supstanci, o čemu ćemo govoriti prilikom objašnjenja mehanizma antibakterijske aktivnosti ispitanih kombinacija. Rezultati kombinovane interakcije sistema timol-linalool su sledeći: 23 (51.11%) interakcija pokazuju sinergizam, 18 (40.00%) aditivno dejstvo, dok 4 (8.89%) interakcije pokazuju antagonizam. Sistem timol-eukaliptol, dao je 8 (17.78%) sinergističkih, 8 (17.78%) aditivnih i 29 (64.44%) antagonističkih interakcija.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema timol-monoterpenoidi u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 77.84% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 17.81% (Slika 36A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 36B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema timol-monoterpenoidi (Slika 36C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.42 (Slika 36D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije timol-eukaliptol, pokazala je snažan antagonizam u odnosu na *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijski soj. Slično ponašanje u vezi ove bakterije, imao je i prethodno diskutovani sistem geraniol-eukaliptol. U grupi B, za vrednosti $FIC_A \leq 0.50$, kombinacije timol-monoterpenoidi pokazale su slab antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *P. mirabilis* ATCC 12453 sojeve. Sa povećanjem sadržaja



Slika 36. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {timol-geraniol (^{1*}); timol-linalool (^{2*}); timol-eukaliptol (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

timola u kombinacijama ispitane grupe (FIC_A ≥ 0.60), dominantan aditivan i sinergistički efekat je uočen (Slika 36B, C). Grupa C, grupa dominantnog aditivnog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija timola, monoterpenoida i ispitanih bakterija. Ova grupa, sadržala je najveći broj ispitanih interakcija i u okviru nje nije zabeležena pojava antagonizma. Visok procenat aditivnih i sinergističkih interakcija ove grupe je posledica interakcija timola sa geraniolom i linaloolom (Slika 36C, D).

4.6.19. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema

linalool-monoterpenoid

Rezultati odgovarajućih interakcija između linaloola i pojedinih terpenoida ulja, dati su u Tabeli 38. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između linaloola i tri monoterpenoida (geraniol, timol i eukaliptol), 47 (34.81%) su pokazali sinergističko delovanje, 49 (36.30%) aditivno dejstvo dok 39 (28.89%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Tabela 38. Antibakterijska aktivnost sistema linalool-monoterpenoid, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

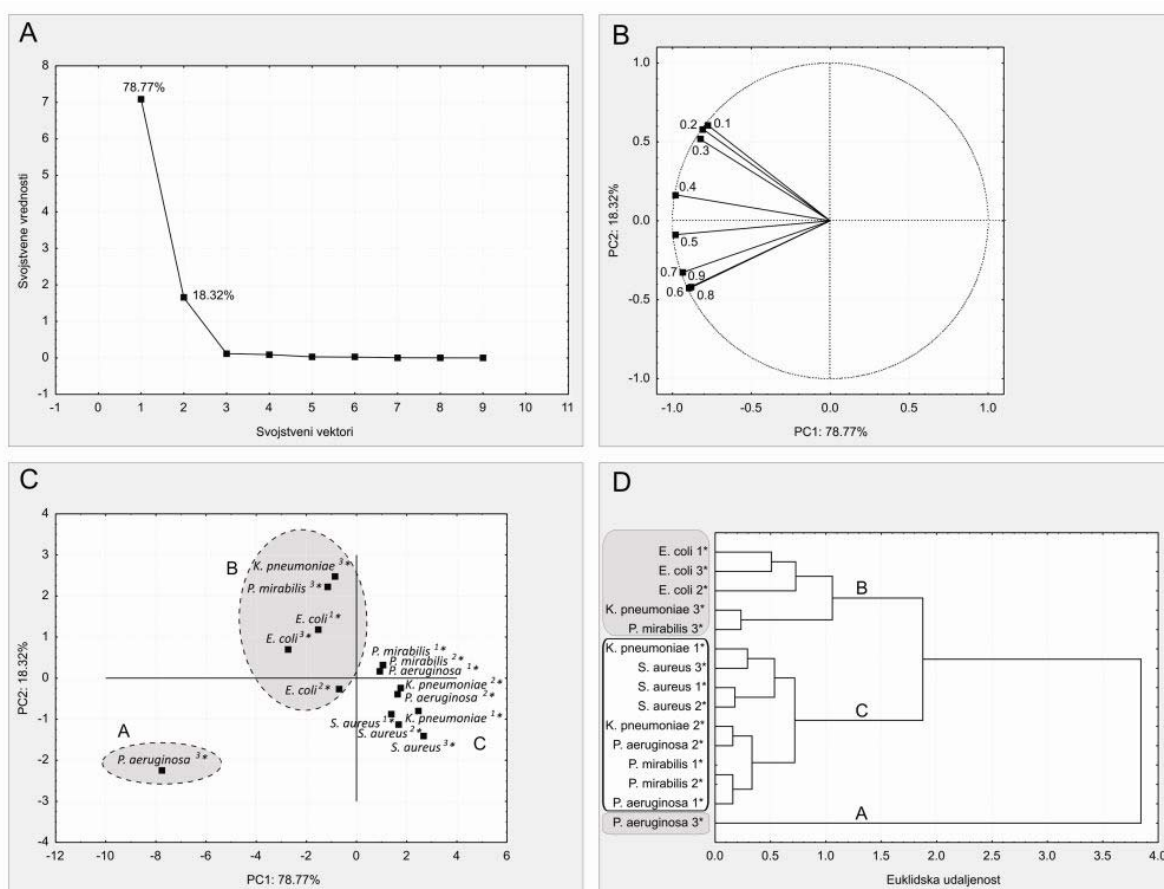
Bakterija	FIC _A indeksi linaloola									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	1.20	1.40	1.21	1.24	1.25	1.08	1.21	1.16	1.28
	^{2*}	0.87	1.04	1.08	1.10	1.25	1.24	1.21	1.16	1.28
	^{3*}	1.20	1.40	1.34	1.38	1.40	1.40	1.38	1.34	1.47
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	0.65	0.68	0.69	0.68	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.80	0.82	0.82	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.24	1.10	0.76	0.87	0.98	1.09
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.87	0.92	0.95	0.96	0.95	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.87	0.92	0.95	0.96	0.95	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.24	1.10	0.92	1.04	0.98	1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	0.87	0.92	0.95	0.96	0.95	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.76	0.80	0.82	0.82	0.80	0.92	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.65	0.68	0.82	0.96	0.95	1.08	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.54	0.68	0.82	0.82	0.95	1.08	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	0.43	0.56	0.69	0.68	0.80	0.76	0.87	0.98	1.09

* Ispitani sistemi: linalool-geraniol (^{1*}); linalool-timol (^{2*}); linalool-eukaliptol (^{3*}).

Najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom linaloola sa timolom. Za ovaj monoterpenoid, ukupan procenat sinergističkih interakcija iznosio je 48.89%. Najviši procenat aditivnog dejstva (46.67%) zabeležen je u kombinaciji linalool-geraniol, dok je najviši procenat antagonizma (57.78%) zabeležen u interakciji linaloola sa eukaliptolom. Slično geraniolu i timolu, najbolji rezultati kombinovane interakcije linaloola i monoterpenoida su postignuti na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213. Na ovom soju, kombinacija linalool-monoterpenoid je pokazala 59.26% sinergističkih interakcija, 40.74% aditivnih interakcija, dok antagonizam nije zabeležen. Na osnovu procenta antagonističkih interakcija, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (14.81%), *P. mirabilis* ATCC 12453 (14.81%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (33.33%), *E. coli* ATCC 25922 (81.48%).

Na osnovu rezultata u Tabeli 38, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema linalool-geraniol, 16 (35.56%) interakcija su sinergističke, 21 (46.67%) aditivna, dok 8 (17.78%) interakcija pokazuju antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema linalool-timol su sledeći: 22 (48.89%) interakcije pokazuju sinergizam, 18 (40.00%) aditivno dejstvo, dok 5 (11.11%) interakcija pokazuju antagonizam. Poređenjem ovih rezultata sa

rezultatima prethodno diskutovanih sistema geraniol-linalool i timol-linalool (Tabele 36 i 37), uočavamo da iste FIC_A vrednosti supstanci različito doprinose sinergizmu. Drugim rečima, u kombinaciji geraniol-linalool, doprinos linaloola aditivnom efektu je izraženiji nego doprinos geraniola. U kombinaciji timol-linalool, doprinos timola sinergizmu je izraženiji nego doprinos linaloola. Kao što je već rečeno, ovo se može objasniti na osnovu hidrofobnosti, lipofilnosti kao i log P vrednosti supstanci, o čemu ćemo govoriti kasnije. Sistem linalool-eukaliptol, dao je 9 (20.00%) sinergističkih, 10 (22.22%) aditivnih i 26 (57.78%) antagonističkih interakcija.



Slika 37. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {linalool-geraniol (1*); linalool-timol (2*); linalool-eukaliptol (3*)} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema linalool-monoterpenoidi u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 78.77% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio

dodatnih 18.32% (Slika 37A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 37B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema linalool-monoterpenoidi (Slika 37C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 1.87 (Slika 37D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena samo od kombinacije linalool-eukaliptol, pokazala je snažan antagonizam u odnosu na *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijski soj. Slično ponašanje u vezi ove bakterije, pokazali su i prethodno diskutovani sistemi geraniol-eukaliptol i timol-eukaliptol. U grupi B, kombinacije linalool-monoterpenoidi pokazale su slab antagonizam u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *P. mirabilis* ATCC 12453 sojeve sa pojavom aditivnih i sinergističkih interakcija. Sa povećanjem sadržaja linaloola u kombinacijama ispitane grupe ($FIC_A \geq 0.50$), dominantan aditivan i sinergistički efekat je uočen u odnosu na *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *P. mirabilis* ATCC 12453 sojeve (Slika 37B, C). Grupa C, grupa dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od svih ostalih kombinacija linaloola, monoterpenoida i ispitanih bakterija. Ova grupa, sadržala je najveći broj ispitanih interakcija i u okviru nje zabeležena pojava antagonizma. Visok procenat sinergističkih i aditivnih interakcija ove grupe je posledica interakcija linaloola sa geraniolom i timolom (Slika 37C, D).

4.6.20. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema eukaliptol-monoterpenoid

Rezultati odgovarajućih interakcija između eukaliptola i pojedinih terpenoida ulja, dati su u Tabeli 39. Na osnovu 135 ispitanih odnosa između eukaliptola i tri monoterpenoida (geraniol, timol i linalool), 24 (17.78%) su pokazali sinergističko delovanje, 22 (16.30%) aditivno dejstvo dok 89 (65.93%) odnosa su pokazali antagonističko delovanje.

Najbolji rezultati antibakterijske aktivnosti su ostvareni kombinacijom eukaliptola sa linaloolom, gde je zbir sinergističkih i aditivnih interakcija iznosio 37.78%. Za sve ispitane monoterpenoide, procenat sinergističkih interakcija iznosio je 17.78%. Najviši procenat aditivnog dejstva (20.00%) zabeležen je u kombinaciji eukaliptol-linalool, dok je najviši procenat antagonizma (68.89%) zabeležen u interakciji eukaliptola sa timolom. Slično geraniolu, timolu i linaloolu, najbolji rezultati kombinovane interakcije eukaliptola i monoterpenoida su postignuti na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213. Na ovom soju,

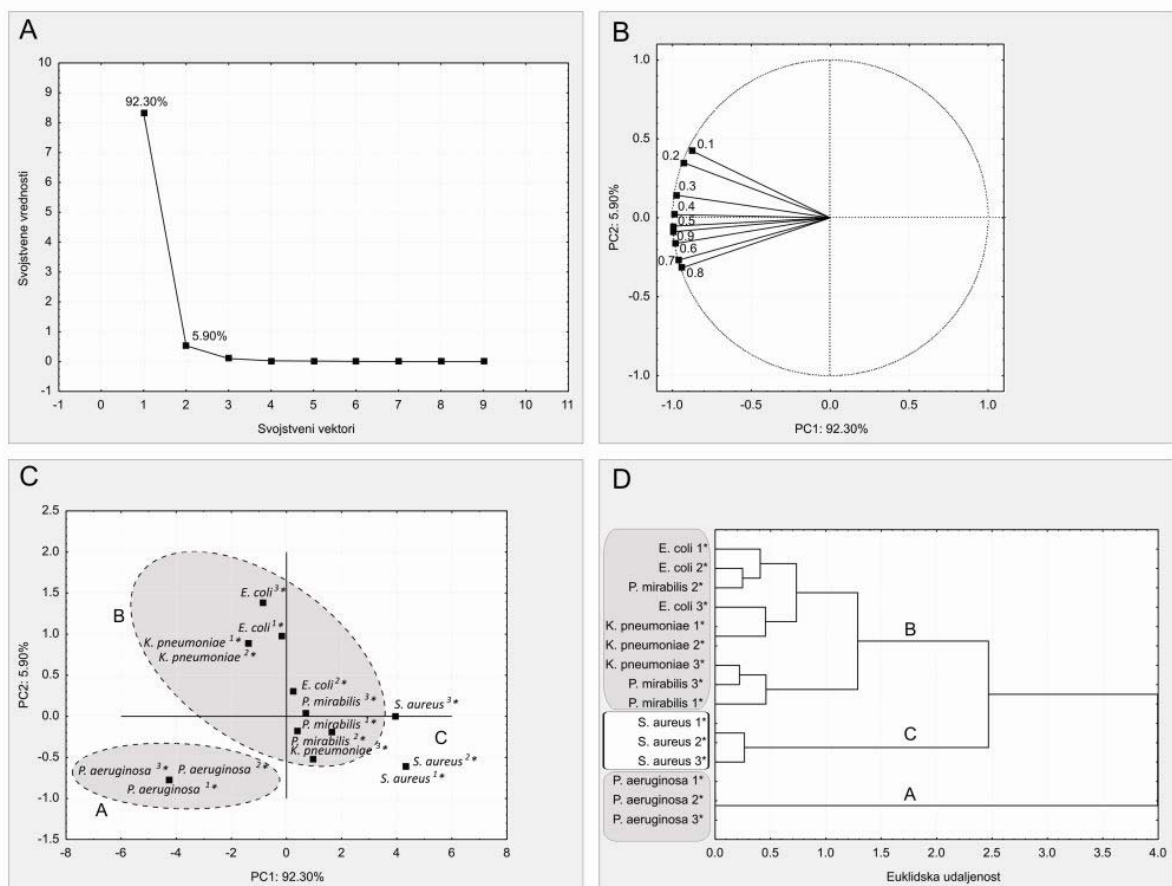
Tabela 39. Antibakterijska aktivnost sistema eukaliptol-monoterpenoid, iskazana FIC i FIC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FIC _A indeksi eukaliptola									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	1.20	1.16	1.21	1.24	1.25	1.24	1.38	1.52	1.85
	^{2*}	0.98	1.04	1.21	1.24	1.25	1.40	1.38	1.34	1.85
	^{3*}	1.20	1.40	1.34	1.38	1.40	1.40	1.38	1.34	2.04
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	1.20	1.40	1.34	1.38	1.55	1.56	1.55	1.70	2.04
	^{2*}	1.20	1.40	1.34	1.38	1.55	1.56	1.55	1.70	2.04
	^{3*}	0.76	0.92	1.08	1.10	1.25	1.24	1.38	1.52	1.66
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	0.76	0.92	0.95	1.10	1.10	1.08	1.21	1.34	1.47
	^{2*}	0.87	1.04	1.08	1.24	1.25	1.40	1.38	1.52	1.85
	^{3*}	0.98	0.92	1.08	1.10	1.25	1.24	1.38	1.52	1.66
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
	^{2*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
	^{3*}	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	0.65	0.44	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{2*}	0.65	0.44	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09
	^{3*}	0.76	0.68	0.43	0.54	0.65	0.76	0.87	0.98	1.09

* Ispitani sistemi: eukaliptol-geraniol (^{1*}); eukaliptol-timol (^{2*}); eukaliptol-linalool (^{3*}).

kombinacija eukaliptol-monoterpenoid je pokazala 77.78% sinergističkih interakcija, 22.22% aditivnih interakcija, dok antagonizam nije zabeležen. Ovde je bitno istaći, da od ispitanih "checkerboard" sojeva, jedino *S. aureus* ATCC 29213 soj je predstavnik Gram-pozitivnih bakterija. Sasvim je poznato, da se slabija rezistentnost Gram-pozitivnih bakterija u odnosu na antibiotike, objašnjava odsustvom spoljne mebrane (McDonnell & Denver Russell, 1999). Na osnovu procenta antagonističkih interakcija sistema eukaliptol-monoterpenoid, redosled bakterijskih sojeva je sledeći: *P. mirabilis* ATCC 12453 (51.85%), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (85.19%), *E. coli* ATCC 25922 (92.59%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (100.00%). Važno je uočiti, da svi ispitani monoterpenoidi u odnosu na *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijski soj, iskazuju antagonističke interakcije kombinovanja sa eukaliptolom.

Na osnovu rezultata u Tabeli 39, pokazano je da od 45 kombinovanih interakcija sistema eukaliptol-geraniol, 8 (17.78%) interakcija su sinergističke, 7 (15.56%) aditivne, dok 30 (66.67%) interakcija pokazuju antagonizam. Rezultati kombinovane interakcije sistema eukaliptol-timol su sledeći: 8 (17.78%) interakcija pokazuju sinergizam, 6 (13.33%) aditivno dejstvo, dok 31 (68.89%) interakcija pokazuju antagonizam. Sistem eukaliptol-linalool, dao je 8 (17.78%) sinergističkih, 9 (20.00%) aditivnih i 28 (62.22%) antagonističkih interakcija.



Slika 38. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {eukaliptol-geraniol (^{1*}); eukaliptol-timol (^{2*}); eukaliptol-linalool (^{3*})} zasnovana na FIC vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FIC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima prethodno diskutovanih sistema (Tabele 36-38), uočavamo da iste FIC_A vrednosti supstanci različito doprinose sinergizmu i antagonizmu. Drugim rečima, u međusobnim kombinacijama čistih supstanci, doprinos eukaliptola sinergizmu i aditivnim interakcijama je manji nego doprinos ostalih monoterpenoida. Kao što je već rečeno, odgovor na ovu pojavu će se tražiti u hidrofobnosti, lipofilnosti i log P vrednosti ispitanih supstanci.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC i FIC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema eukaliptol-monoterpenoidi u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 92.30% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 5.90% (Slika 38A). Dijagram odgovornih FIC_A varijabli (Slika 38B), ilustruje uticaj FIC vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema eukaliptol-

monoterpenoidi (Slika 38C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.47 (Slika 38D), HCA analiza je identifikovala tri grupe interakcija (A, B i C). Grupa A, sastavljena od kombinacija eukaliptol-monoterpenoidi, pokazala je snažan antagonizam u odnosu na *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterijski soj. Grupa B, grupa dominantnog antagonizma, sadržala je najveći broj ispitanih interakcija na *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *P. mirabilis* ATCC 12453 sojeve. U okviru ove grupe, zabeležene su nešto niže vrednosti antagonizma, kao i pojava dominantnih sinergističkih i aditivnih efekata ($FIC_A \leq 0.40$) kod soja *P. mirabilis* ATCC 12453 (Slika 38C, D). Grupa C, grupa dominantnog sinergističkog dejstva, sastojala se od kombinacija eukaliptola i monoterpenoida na soju *S. aureus* ATCC 29213. Kao što se može videti, sinergizam eukaliptola i ostalih monoterpenoida uočen je jedino kod Gram-pozitivne bakterije (Slika 38C, D).

4.6.21. Analiza antibakterijske aktivnosti sistema geranil acetat-monoterpenoid

Rezultati odgovarajućih interakcija između geranil acetata i pojedinih terpenoida ulja dati su u Tabeli 40. Kako geranil acetat nije pokazao antibakterijsku aktivnost u odnosu na ispitane "checkerboard" sojeve, ovde ne govorimo o sinergizmu, aditivnim interakcijama ili antagonizmu, već govorimo o uvećanju i pojačanju antibakterijske aktivnosti terpenoida (Chou, 2010).

Kao što je već rečeno, za sinergističke, aditivne i antagonističke interakcije, koje su obostrane za kombinovane supstance, neophodno je odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju. Pošto kombinovani geranil acetat nema inhibitornu koncentraciju, ovde govorimo samo o uvećanju aktivnosti monoterpenoida, koja se izražava stepenom uvećanja, procentom ili u našem slučaju FIC_B indeksom monoterpenoida (Chou, 2010).

Na osnovu rezultata datih u Tabeli 40, uočavamo da geranil acetat nema uticaj na antibakterijsku aktivnost ispitanih monoterpenoida ($FIC_B = 1.00$). Ujedno, zbog jednoličnosti rezultata i odsustva varijanse, hemometrijska PCA i HCA analiza je zanemarena. Ishod ovog istraživanja nam ukazuju, da visok procenat geranil acetata u uljima poput *T. glabrescens* (19.38%) i *T. pulegioides* (8.47%) nema uticaj na aktivnost geraniola i ostalih proučavanih monoterpenoida.

4.6.22. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema limonen-monoterpenoid

Rezultati odgovarajućih interakcija između limonena i monoterpenoida dati su u Tabeli 41. Kako limonen, slično geranil acetatu, nije pokazao antibakterijsku aktivnost u odnosu na ispitane "checkerboard" sojeve, ovde govorimo o uvećanju aktivnosti monoterpenoida, koja

Tabela 40. Antibakterijska aktivnost sistema geranil acetat-monoterpenoid, iskazana FIC_B i FC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija		FC_A indeksi geranil acetata								
		0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

* Ispitani sistemi: geranil acetat-geraniol (^{1*}); geranil acetat-timol (^{2*}); geranil acetat-linalool (^{3*}); geranil acetat-eukaliptol (^{4*}).

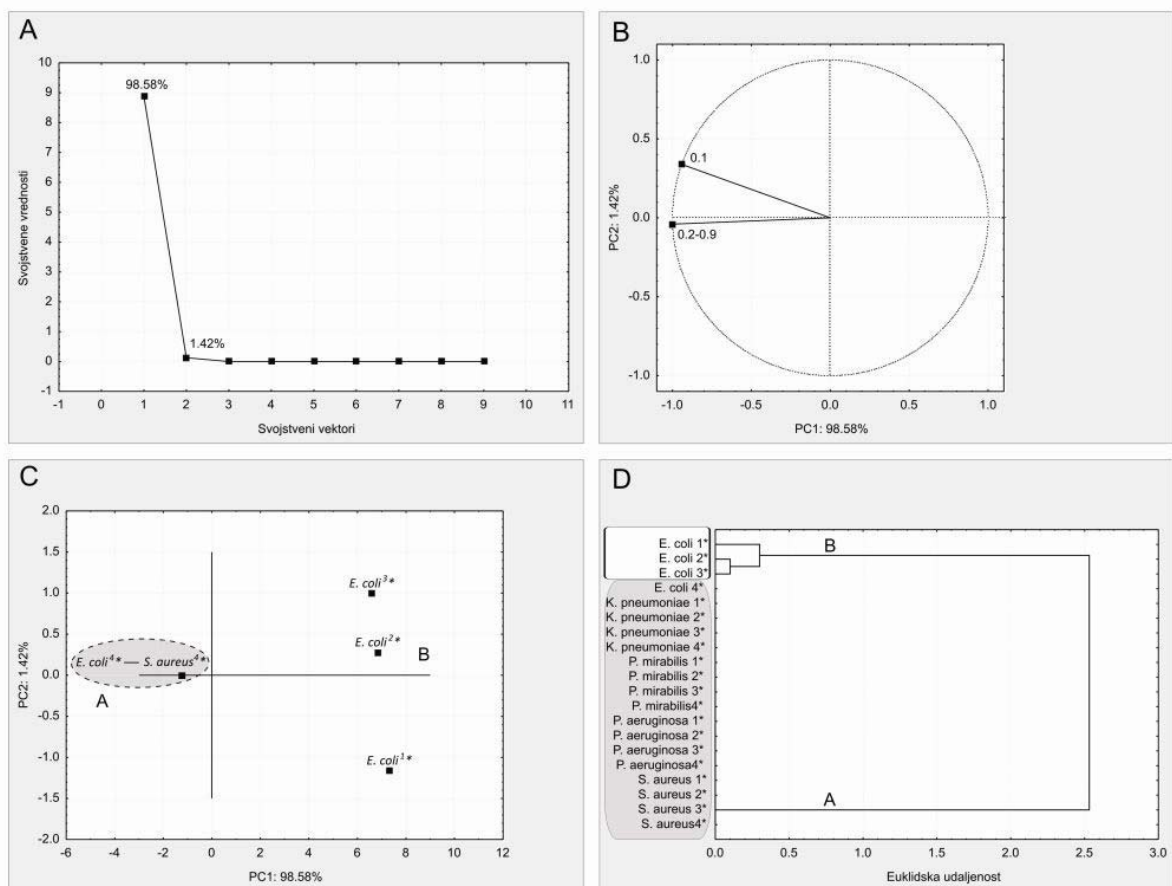
se izražava stepenom uvećanja, procentom ili FIC_B indeksom monoterpenoida (Chou, 2010). Na osnovu rezultata datih u Tabeli 41, uočavamo da limonen za razliku od geranil acetata utiče na antibakterijsku aktivnost pojedinih monoterpenoida ($FIC_B \neq 1.00$). Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve FIC_B i FC_A vrednosti u cilju pronalaska sličnog antibakterijskog ponašanja sistema limonen-monoterpenoidi u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 98.58% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 1.42% (Slika 39A). Dijagram odgovornih FC_A varijabli (Slika 39B), ilustruje uticaj FIC_B vrednosti na klasifikaciju posmatranih antibakterijskih interakcija sistema limonen-monoterpenoidi (Slika 39C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 2.53 (Slika 39D), HCA analiza je identifikovala dve grupe interakcija (A i B). Grupa A, grupa najvećeg broja

Tabela 41. Antibakterijska aktivnost sistema limonen-monoterpenoid, iskazana FIC_B i FC_A indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FC_A indeksi limonena									
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1.00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	0.50	0.30	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	^{2*}	0.70	0.30	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	^{3*}	0.80	0.30	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{2*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{3*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	^{4*}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

* Ispitani sistemi: limonen-geraniol (^{1*}); limonen-timol (^{2*}); limonen-linalool (^{3*}); limonen-eukaliptol (^{4*}).

ispitanih interakcija, pokazala je indiferentan uticaj limonena na antibakterijsku aktivnost monoterpenoida na *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *S. aureus* ATCC 29213 sojeve (Slika 39C, D). Ispitane kombinacije grupe B, odlikovale su se povećanjem aktivnosti monoterpenoida u odnosu na *E. coli* ATCC 25922. Kombinacije grupe B, za vrednosti $FC_A \geq 0.20$, karakterisale su se znatnim uvećanjem aktivnosti monoterpenoida ($FIC_B \leq 0.30$), što je u najvećem broju slučaja iznosilo 10 puta (Slika 39B, C). Pojačanje antibakterijske aktivnosti eukaliptola limonenom u odnosu na *E. coli* ATCC 25922 nije zabeležen. Ishod ovog istraživanja nam ukazuje, da visok procenat limonena u uljima poput *P. officinale* (13.75%) i *P. longifolium* (8.23%), može znatno povećati antibakterijsku aktivnost pojedinih komponenti ulja u odnosu na *E. coli* ATCC 25922.



Slika 39. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti ispitanih sistema {limonen-geraniol (¹*); limonen-timol (²*); limonen-linalool (³*); limonen-eukaliptol (⁴*)} zasnovana na FIC_B vrednostima: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih FC_A varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih interakcija; (D) dendrogram HCA analize.

4.6.23. Analiza antibakterijske aktivnosti sistema limonen-geranil acetat

Rezultati odgovarajućih interakcija između limonena i geranil acetata dati su u Tabeli 42. Kako geranil acetat a ni limonen, nisu pokazali antibakterijsku aktivnost u odnosu na ispitane "checkerboard" sojeve, ovde ne možemo govoriti niti o sinergizmu, aditivnim interakcijama antagonizmu, niti o uvećanju i pojačanju antibakterijske aktivnosti supstanci. Na osnovu rezultata datih u Tabeli 42, uočavamo da kombinacija limonena i geranil acetat nema antibakterijsku aktivnost na ispitanim sojevima (FC_B = 1.00). Ujedno, zbog jednoličnosti rezultata i odsustva varijanse, hemometrijska PCA i HCA analiza je zanemarena. Ishod ovog istraživanja ukazuje da kombinacija antibakterijsko neaktivnih supstanci, ne može posedovati antibakterijska svojstva i eliminiše bilo kakvu sumnju vezano za istraživanje "checkerboard" metodom.

Tabela 42. Antibakterijska aktivnost sistema limonen-geranil acetat, iskazana FC_A i FC_B indeksima ispitanih supstanci.

Bakterija	FC_A indeksi limonena								
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

4.6.24. Hemometrijska analiza antibakterijske aktivnosti sistema supstanca-antibiotik-bakterijski soj

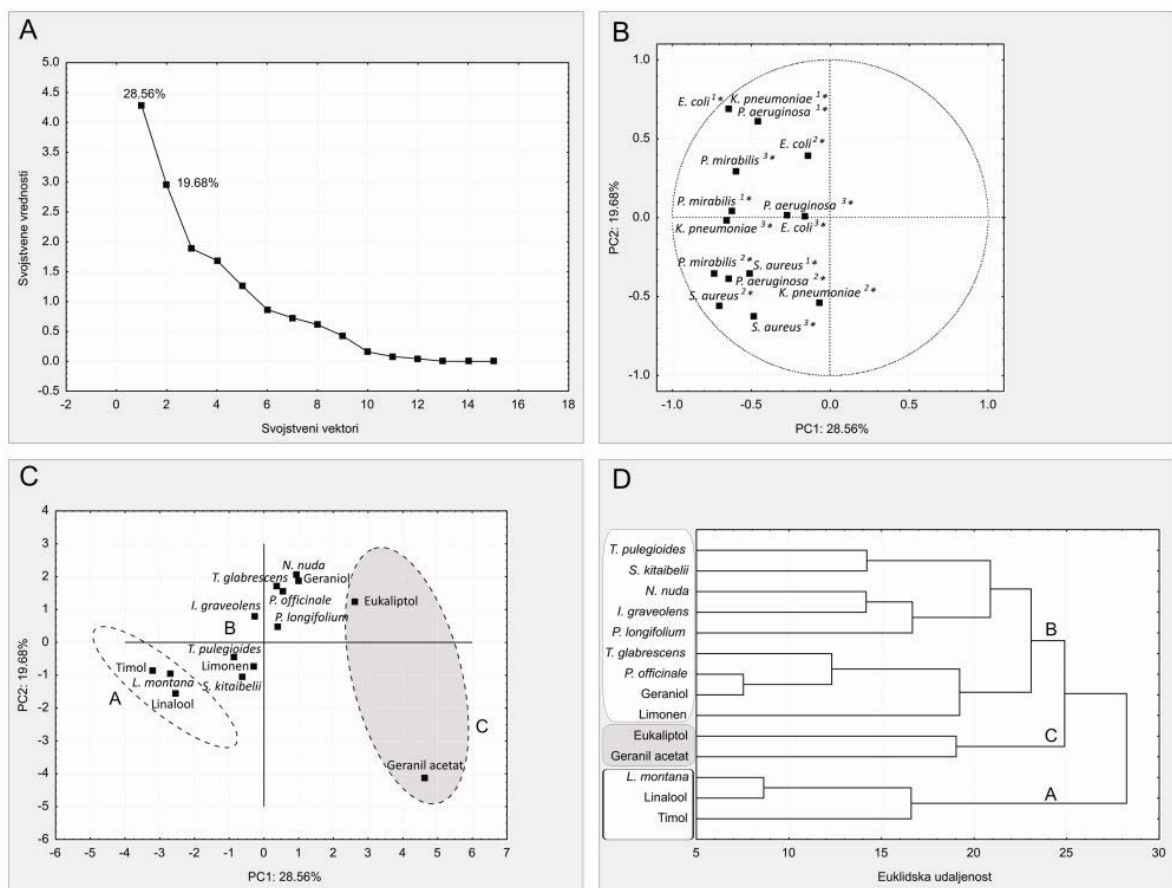
Na osnovu prethodno diskutovanih rezultata (Tabele 22-35), cilj ovog istraživanja je bio pronalazak supstanci sa sličnim efektom pojačanja antibakterijske aktivnosti antibiotika. Pojačanje aktivnosti antibiotika, izraženo stepenom smanjenja njihove MIC vrednosti na osnovu minimalnih FIC_A i FC_A vrednosti supstanci, dato je u Tabeli 43.

Hemometrijska PCA i HCA analiza je primenjena na sve vrednosti Tabele 43, u cilju pronalaska supstanci sa sličnim efektom pojačanja antibakterijske aktivnosti antibiotika u odnosu na ispitane sojeve. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 28.56% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 19.68% (Slika 40A). Dijagram odgovornih varijabli (Slika 40B), ilustruje uticaj sistema antibiotik-bakterijski soj na klasifikaciju posmatranih supstanci (Slika 40C). Na osnovu euklidske udaljenosti i sličnosti ≥ 24.90 (Slika 40D), HCA analiza je identifikovala tri grupe supstanci (A, B i C). Grupa A, sastavljena od etarskog ulja *L. montana*, timola i linaloola, pokazala je najbolju interakciju sa antibioticima na ispitanim sojevima. Ova grupa je u kombinaciji sa izabranim antibioticima smanjila njihovu MIC vrednost 10 puta i to u 11, od 15 ispitivanih sistema. Grupa B, grupa najvećeg broja ispitanih supstanci, sadržala je nešto niže vrednosti interakcija u odnosu na grupu A, ali i dalje je pokazala izuzetne rezultate u pogledu smanjenja MIC vrednosti antibiotika. Ustanovljeno je desetostruko smanjenje MIC vrednosti, u 10, od 15 proučavanih kombinacija. S druge strane, eukaliptol i geranil acetat, u okviru grupe C, nisu dali zadovoljavajuće rezultate. Grupa C se karakteriše neznatnim

Tabela 43. Stepen smanjenja MIC vrednosti antibiotika na testiranim bakterijskim sojevima, usled kombinovane interakcija sa ispitanim supstancama, minimalnih FIC_A i FC_A vrednosti.

Bakterija		<i>T. pulegioides</i>	<i>T. glabrescens</i>	<i>S. kitaibelii</i>	<i>N. nuda</i>	<i>L. montana</i>	<i>P. longifolium</i>	<i>P. officinale</i>	<i>I. graveolens</i>	Geraniol	Timol	Linalool	Eukaliptol	Geranil acetat	Limonen
<i>E. coli</i> ATCC 25922	^{1*}	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	2.0	10.0
	^{2*}	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	–	10.0	3.3	10.0	10.0	1.4	10.0	2.5	10.0
	^{3*}	–	10.0	–	–	–	–	–	–	–	10.0	–	–	–	10.0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	^{1*}	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	2.5	10.0
	^{2*}	2.5	2.0	10.0	–	2.5	–	2.5	3.3	2.0	2.0	3.3	–	5.0	5.0
	^{3*}	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	5.0	10.0	10.0	–	5.0	10.0
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	^{1*}	10.0	5.0	–	5.0	10.0	3.3	5.0	10.0	10.0	10.0	10.0	2.0	2.0	10.0
	^{2*}	3.3	3.3	3.3	–	10.0	2.0	5.0	2.5	2.5	10.0	10.0	1.4	2.5	1.1
	^{3*}	3.3	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	–	2.0	10.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	^{1*}	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	1.4	2.0
	^{2*}	3.3	2.5	2.5	–	10.0	1.7	2.0	1.7	1.7	10.0	10.0	5.0	2.5	1.2
	^{3*}	–	–	–	–	–	–	–	10.0	–	10.0	–	5.0	1.2	–
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	^{1*}	10.0	–	10.0	10.0	10.0	10.0	–	10.0	–	10.0	10.0	–	5.0	1.4
	^{2*}	10.0	2.5	10.0	–	10.0	–	2.5	3.3	2.0	10.0	10.0	–	3.3	10.0
	^{3*}	10.0	–	10.0	–	10.0	10.0	–	–	–	10.0	10.0	5.0	5.0	10.0

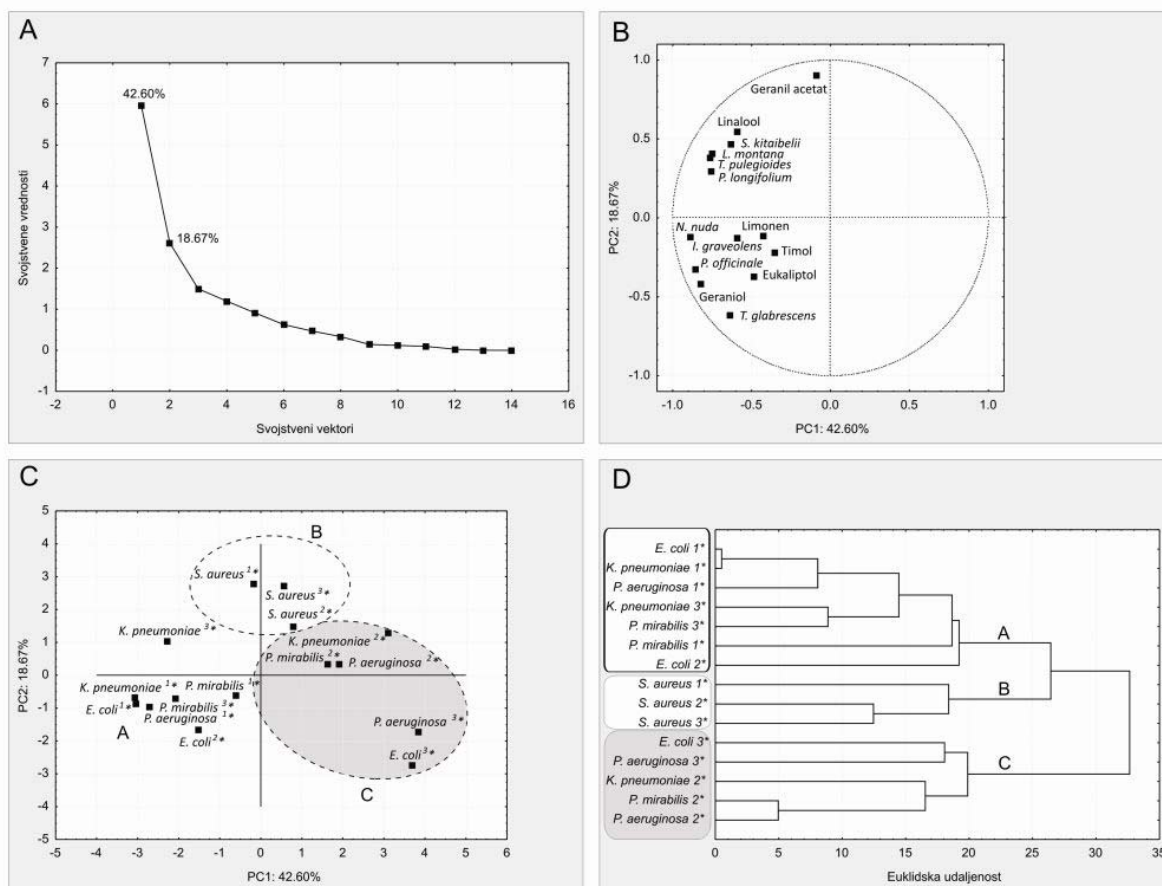
* Ispitani antibiotici: hloramfenikol (^{1*}); tetraciklin (^{2*}); streptomycin (^{3*}).



Slika 40. Hemometrijska analiza sinergističkog potencijala ispitanih supstanci zasnovana na stepenu smanjenja MIC vrednosti ispitanih antibiotika: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih supstanci; (D) dendrogram HCA analize.

smanjenjem MIC vrednosti antibiotika ili indiferentnošću eukaliptola u odnosu na posmatrane sisteme (Slika 40B, D). Međutim, izuzev eukaliptola, rezultati grupe C su ohrabrujući, imajući na umu da geranil acetat iako nema antibakterijsku aktivnost snižava MIC vrednost antibiotika.

Hemometrijskom analizom diskutovanih rezultata (Tabela 43), želeli smo objasniti ponašanje sistema supstanaca-antibiotik-bakterijski soj zavisno od ispitane supstance. Ovo bi pomoglo boljem sagledavanju kombinacija supstanci sa antibioticima i uočavanju rezistentnih bakterijskih sojeva. Na osnovu svojstvenih vrednosti korelacionog matriksa, PC1 svojstveni vektor objasnio je 42.60% varijanse ispitanih interakcija, dok je PC2 vektor objasnio dodatnih 18.67% (Slika 41A). Dijagram odgovornih varijabli (Slika 41B), ilustruje uticaj ispitanih supstanci na klasifikaciju sistema supstanaca-antibiotik-bakterijski soj (Slika 41C).



Slika 41. Hemometrijska analiza sistema supstancas-antibiotik-bakterijski soj zasnovana na sinergizmu ispitanih antibiotika i supstanci: (A) svojstvene vrednosti PCA korelacionog matriksa; (B) PCA dijagram odgovornih varijabli; (C) rezultujući PCA dijagram ispitanih sistema; (D) dendrogram HCA analize. Ispitan sinergizam (stepen smanjenja MIC vrednosti antibiotika) dat je u Tabeli 43.

Na osnovu euklidske udaljenosti i slicnosti ≥ 26.40 (Slika 41D), HCA analiza je identifikovala tri grupe sistema (A, B i C). Sistem A, grupa sastavljena od dominantnih interakcija Gram-negativnih bakterija sa hloramfenikolom, pokazala je najbolje rezultate sa ispitanim supstancama. U ovoj grupi, u najlošijem slucaju, 7 od 14 ispitanih supstanci su uspele desetostruko da povecaju aktivnost antibiotika u odnosu na ispitane sojeve. Sistem B, grupa interakcija Gram-pozitivnih bakterija sa antibioticima, sadrzala je nešto nize vrednosti interakcija u odnosu na grupu A. U ovoj grupi, u najlošijem slucaju, 6 od 14 ispitanih supstanci su uspele desetostruko da povecaju aktivnost antibiotika u odnosu na ispitane sojeve. Sistem C, grupa interakcija Gram-negativnih bakterija sa streptomycinom i tetraciklinom, imala je najlošije rezultate kombinovanja sa ispitanim supstancama. U ovoj grupi, u najboljem slucaju, 3 od 14 ispitanih supstanci su uspele desetostruko da povecaju

aktivnost antibiotika. Najlošiji rezultati uočeni su kombinovanjem supstanci sa streptomycinom na *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 sojeve (Slika 41C, D). Na osnovu svih dosada prezentovanih rezultata (Tabele 22-43), uočavamo da većina etarskih ulja, znatno nižeg antibakterijskog potencijala, u kombinaciji sa antibioticima ispoljavaju dominantna i vrlo jaka sinergistička dejstva. Takođe uočavamo i da mnoge čiste supstance i glavne komponente etarskih ulja, tipa timola i linaloola, pokazuju izvanredna sinergistička dejstva sa pojedinim antibioticima. Sa druge strane uočavaju se i dominantne antagonističke interakcije ulja *N. nuda* i njene glavne komponente eukaliptola sa antibioticima. Na osnovu interakcija supstanci sa antibioticima, možemo uočiti dominantan sinergizam sa hloramfenikolom, aditivne interakcije sa tetraciklinom i dominantan antagonizam sa streptomycinom. Uočavamo i pojavu jakih antagonističkih interakcija ispitanih supstanci sa streptomycinom na sojevima tipa *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853. Na osnovu povećanja aktivnosti antibiotika ispitanim supstancama (Slika 41C, D), vidimo i odvajanje Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* ATCC 29213 u odnosu na ostale "checkerboard" Gram negativne sojeve. Pokazano je da supstance koje nemaju antibakterijsku aktivnost (geranil acetat i limonen) u znatnoj meri mogu povećati aktivnost antibiotika na ispitanim sojevima. Takođe je pokazano da ove komponente nemaju uticaj na aktivnost monoterpenoida ili je njihov uticaj neznatan. Na osnovu međusobne interakcije monoterpenoida ulja, izuzev eukaliptola, uočavamo dominantnu pojavu aditivnih interakcija. Takođe, njihovom međusobnom kombinacijom, uočavamo različit doprinos sinergističkim, aditivnim i antagonističkim interakcijama.

Pokušaj objašnjenja svega navedenog, tražićemo u hidrofobnosti, lipofilnosti i log P vrednostima dominantnih komponenata ulja. Implementacijom SAR metode i molekulskim simulacijama na odgovarajućim receptorima bakterije, pokušaćemo objasniti antibakterijsku aktivnost ispitanih kombinacija.

4.7. Akumulacija ispitivanih terpenoida i antibiotika u citoplazmatičnoj membrani

Rezultati maksimalnih koncentracija ispitanih antibiotika i dominantnih komponenata ulja dati su u Tabeli 44. Na osnovu MMC vrednosti, možemo uočiti i objasniti značajan deo eksperimentalnih rezultata. Antibiotici svoju antibakterijsku aktivnost ostvaruju na ribozomima, dok je aktivnost etarskog ulja i komponenta pripisana razaranju ćelijske membrane. Ovde se radi o različitom mehanizmu antibakterijskog dejstva, čija je potvrda značajna razlika MIC i MBC vrednosti antibiotika i ispitanih supstanci (Tabele 17-21). Različiti mehanizmi supstanci bili su povod za ispitivanje njihovog kombinovanog dejstva a uočene sinergističke interakcije bi smanjile toksične koncentracije antibiotika i precizirala

Tabela 44. Vrednosti $\log P_{o/w}$, $\log P_{m/b}$, S i MMC ispitanih supstanci.

Ispitane supstance	$\log P_{o/w}$ ^{a)} (mM)	$\log P_{m/b}$ ^{b)} (mM)	S ^{c)} (mg/l)	MMC ^{d)} (mg/l)
Monoterpenški ugljovodonici				
Sabinen	3.10	2.37	2.49	0.58×10^3
Mircen	4.30	3.53	6.92	23.46×10^3
α -Felandren	3.20	2.46	2.86	0.83×10^3
p-Cimen	4.10	3.34	27.88	60.99×10^3
Limonen	3.40	2.66	4.58	2.09×10^3
Oksidovani monoterpeni				
Eukaliptol	2.50	1.79	3.32×10^2	20.48×10^3
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	2.10	1.40	4.40×10^2	11.07×10^3
Linalool	2.70	1.98	15.90×10^2	151.84×10^3
Borneol	2.70	1.98	7.40×10^2	70.67×10^3
Nerol	2.90	2.17	2.56×10^2	37.84×10^3
Geraniol	2.90	2.17	1.00×10^2	14.79×10^3
Bornil acetat	3.30	2.56	9.72	3.53×10^3
Geranil acetat	3.50	2.76	18.24	10.50×10^3
Seskviterpenški ugljovodonici				
α -Kubeben	4.50	3.73	21.45×10^{-3}	0.12×10^3
β -Elemen	6.10	5.28	11.72×10^{-3}	2.23×10^3
β -Kariofilen	4.40	3.63	50.11×10^{-3}	0.21×10^3
Germakren D	4.70	3.92	12.83×10^{-3}	0.11×10^3
Oksidovani seskviterpeni				
Kariofilen oksid	3.60	2.85	2.21	1.56×10^3
τ -Kadinol	3.30	2.56	9.13	3.31×10^3
α -Bisabolol	3.80	3.05	1.69	1.89×10^3
Fenolna jedinjenja				
Timol	3.30	2.56	9.00×10^2	326.77×10^3
Antibiotici				
Tetraciklin	-2.00	-2.58	2.31×10^2	607.53×10^{-3}
Streptomycin	-8.00	-8.40	1.00×10^6	3.98×10^{-3}
Hloramfenikol	1.10	0.43	2.50×10^4	67.25×10^3

^{a)} $\log P_{o/w}$ = Particioni koeficijent oktanol/voda (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

^{b)} $\log P_{m/b}$ = Particioni koeficijent ćelijska membrana/pufer, izraćunat na osnovu Sikkema et al. (1994)

^{c)} S = Rastvorljivost u vodi (mg/L) na 25 °C (<http://www.thegoodscentscompany.com/>) i (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

^{d)} MMC = Maksimalna koncentracija supstanci u ćelijskoj membrani izraćunata na osnovu de Bont (1998) i Neumann et al. (2005).

taćna mesta napada komponentata ulja. Na osnovu rezultata (Tabela 44), uoćavamo da meću komponentama ulja najveću membransku koncentraciju ima timol (326.77×10^3 mg/l), a najnižu germakren D (0.11×10^3 mg/l). Zbog velike sposobnosti akumuliranja, timol bi trebao najviše da vrši dezorganizaciju citoplazmatićne membrane, što bi trebalo da uslovi njegove najniže MIC i MBC vrednosti. Ova konstatacija je potvrđena na osnovu naših

eksperimentalnih rezultata (Tabela 19). Linalool, druga supstanca po sposobnosti akumulacije u membrani (151.84×10^3 mg/l), nema izraženu antibakterijsku aktivnost, što ukazuje da osim koncentracionog faktora i energetski uslovi interakcije sa targetom diktiraju antibakterijsku aktivnost supstance. Više reči o interakciji komponenata i određenih targeta biće u delu molekularnog dokinga. I pored slabije antibakterijske aktivnosti, linalool slično timolu je pokazao izvanredna sinergistička dejstva sa antibioticima (Slika 40). U poređenju sa timolom, membranska koncentracija geraniola je znatno niža (14.79×10^3 mg/l), što uslovljava i njegovu nešto slabiju antibakterijsku aktivnost (Tabela 19). Hemometrijskom analizom MIC i MBC vrednosti (Slike 19, 20) u grupu jakih antibakterijskih agenasa pored ispitanih antibiotika, svrstani su timol, geraniol i etarska ulja *T. pulegioides* i *T. glabrescens*. Pored izvesnog sadržaja timola i linaloola ova ulja kao dominantnu komponentu sadrže geraniol. I pored niže membranske koncentracije, izražena antibakterijska aktivnost geraniola u odnosu na linalool može se objasniti energetskim efektima interakcija sa definisanim targetima. Pokazano je da etarska ulja *T. pulegioides* i *T. glabrescens* imaju veću antibakterijsku aktivnost u odnosu na geraniol (Tabele 17, 19). Ovo se može prepisati membranskim koncentracijama timola, linalola, geraniola, i njihovim dominantnim aditivnim i sinergističkim interakcijama (Tabele 36-38). Interakcije ispitanih komponenata, nedvosmisleno ukazuju na identičan mehanizam njihovog antibakterijskog dejstva i vezivanje za identične targete citoplazmatične membrane.

Na osnovu rezultata (Tabela 44), uočavamo da među ispitanim antibioticima najveću membransku koncentraciju ima hloramfenikol (67.25×10^3 mg/l), a najnižu streptomycin (3.98×10^3 mg/l). Međutim kao što je već pokazano, ispitani antibiotici deluju na nivou ribozoma a ne na nivou citoplazmatične membrane, tako da visoka koncentracija u njoj ne mora značiti veću i bolju antibakterijsku aktivnost antibiotika. Potvrda ove konstatacije su i naši eksperimentalni rezultati (Tabela 21), gde je hemometrijskom analizom (Slike 19, 20) pokazana slabija antibakterijska aktivnost hloramfenikola u odnosu na tetraciklin i streptomycin. Visoka membranska koncentracija antibiotika je povoljna u uslovima nastanka nespecifične izmene membrane i njene lize dejstvom komponenata ulja, usled koje antibiotik najviših koncentracija najlakše ostvaruje svoju aktivnost na ribozomu. Potvrda ove konstatacije su i naši eksperimentalni podaci, gde su najbolji rezultati ostvareni kombinovanom interakcijom ulja sa hloramfenikolom a najlošiji sa streptomycinom. Ovde nikako ne trebamo izostaviti energetsku zahtevnost ulaska antibiotika u citoplazmu, jer samo zajedničko promatranje ova dva faktora može objasniti uočene pojave i mehanizam dejstva ispitanih kombinacija.

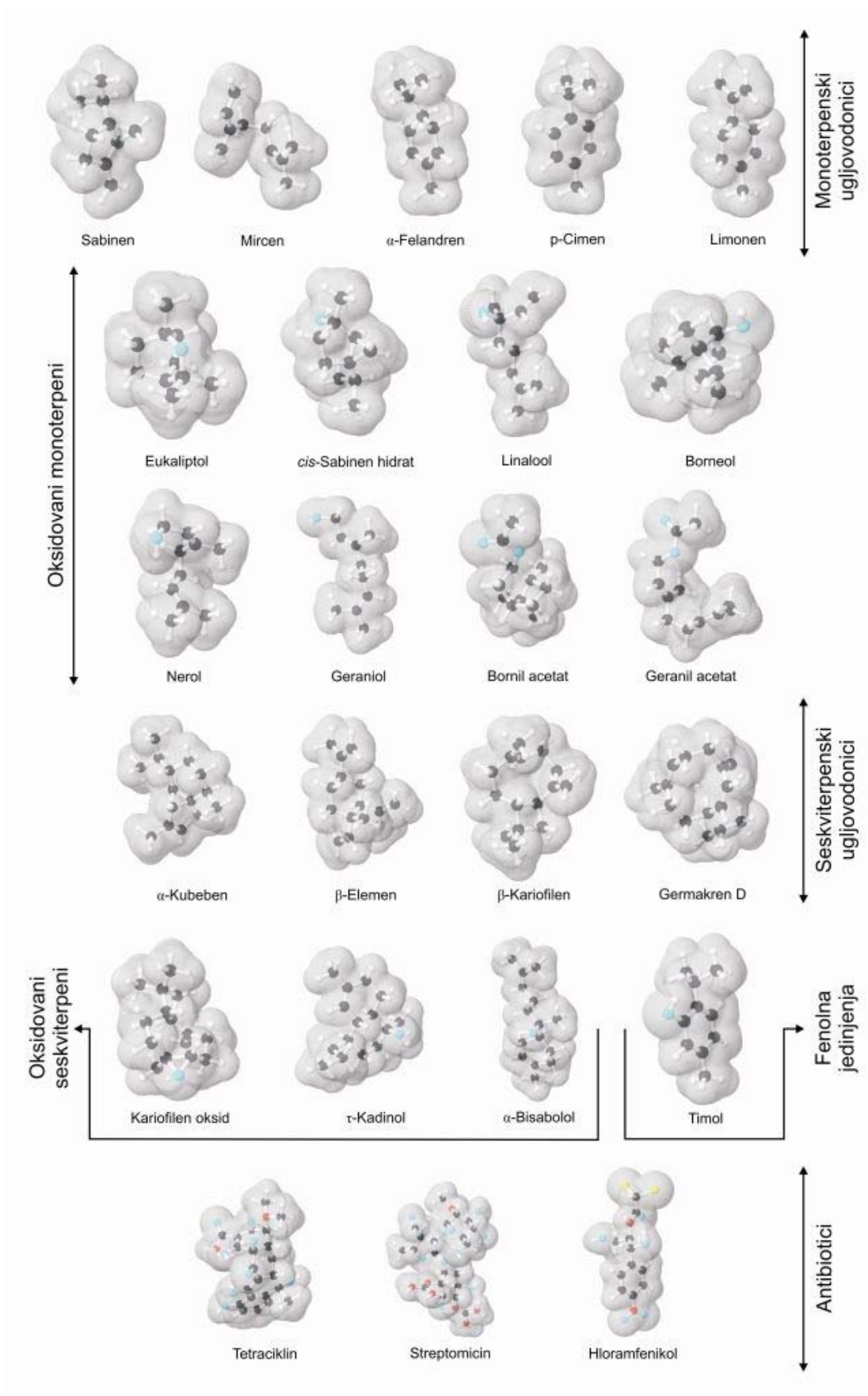
4.8. Molekularni doking na ćelijske receptore

U nastojanju da preciznije definišemo targete aktivnosti etarskih ulja i objasnimo mehanizam njihovog kombinovanog dejstva sa izabranim antibioticima, koristili smo hemometrijsku metodu molekularnog dokinga. Ispitani targeti citoplazmatične membrane su: proteini PBP-1A i PBP-1B (Contreras-Martel, 2006; Sung et al., 2009), citohrom C oksidaza (Harrenga & Michel, 1999) i ATP sintaza (Rastogi & Girvin, 1999).

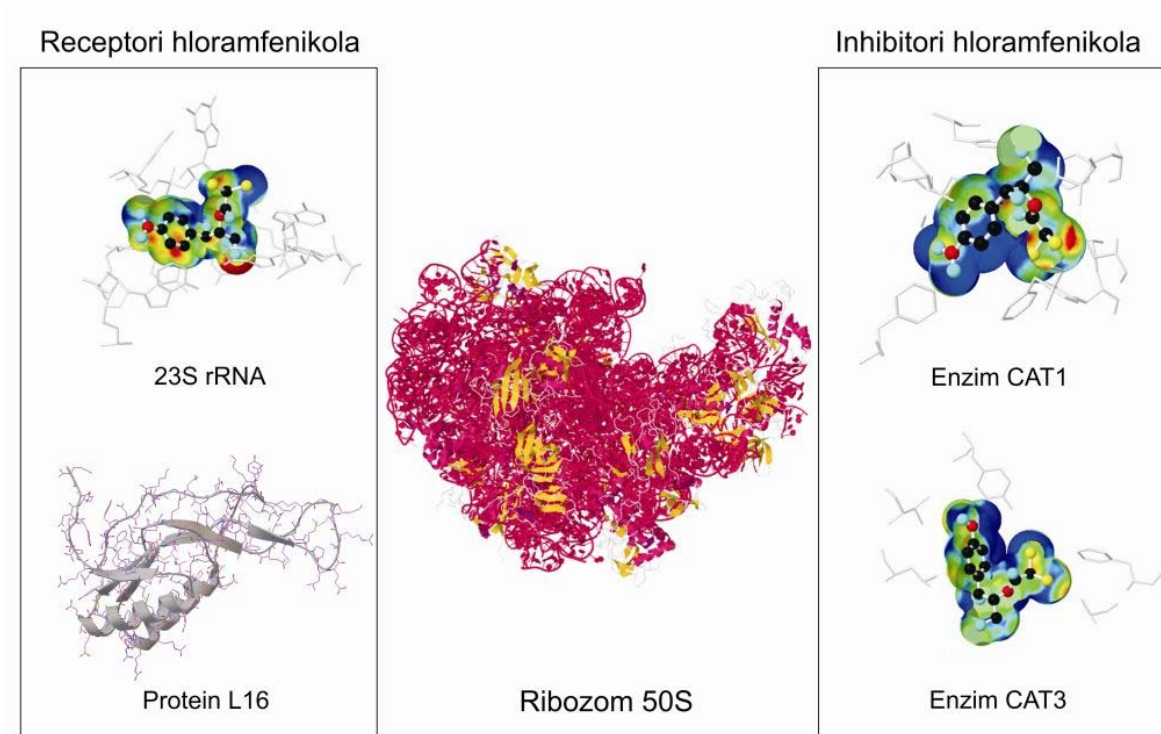
4.8.1. Molekularni doking na receptore antibakterijske aktivnosti hloramfenikola

Kao što je u ranijim poglavljima jasno definisano, hloramfenikol inhibira sintezu proteina usled vezivanja za veću 50S subjedinicu ribozoma, u okviru aminoakceptorskog A mesta (Davidovitch et al., 2008). Na ovaj način sprečeno je pravilno pozicioniranje i unos sledeće aminoacil-tRNA i dalja sinteza proteina. Ispitivanja su pokazala da su protein L16 i 23S rRNA, delovi 50S subjedinice, upravo odgovorni za antibakterijsko dejstvo hloramfenikola (Mankin & Garret, 1991; Anderson et al., 2012). Ovo nas je navelo da molekularnim dokingom ispitujemo strukture 23S RNA i L16 (Bulkley et al., 2010; Tourigny et al., 2013) i uočimo afinitet vezivanja komponenata ulja na ove važne targete. Molekularnom dokingu podvrgnuti su antibiotici, čiste supstance i sve komponente ulja čiji je sadržaj bio viši od 5%. Strukture ispitanih molekula sa odgovarajućim Van der Waalsovom radijusom prikazane su na Slici 42. Rezistencija bakterija na hloramfenikol, usled njegove inaktivacije enzimima tipa CAT, i izražene sinergističke interakcije hloramfenikola sa etarskim uljem, navelo su nas da molekularnim dokingom ispitamo interakcije komponenata sa ovim enzimom. Ukoliko bi se molekularnim dokingom potvrdio veći afinitet vezivanja komponenata ulja, mogli bi opravdati manju CAT aktivnost, a samim tim i bolje rezultate antibakterijske aktivnosti smeše hloramfenikol-ulja. Predmet molekularnog ispitivanja bili su enzimi CAT1 i CAT3 (Leslie, 1990; Biswas et al., 2012). Ispitani targeti molekularnog dokinga važnih za hloramfenikol, prikazani su na Slici 43.

Na osnovu rezultata u Tabeli 45, uočavamo znatno niže energetske afinitete vezivanja komponenata ulja u odnosu na receptorska mesta antibakterijske aktivnosti hloramfenikola (23S RNA i protein L16). Takođe možemo uočiti i veći afinitet vezivanja tetraciklina i streptomicina za ove targete u odnosu na hloramfenikol. Ovi rezultati nam potvrđuju prethodne literaturne navode da komponente etarskih ulja ne mogu ostvariti svoju aktivnosti na nivou ribozoma za razliku od ispitanih antibiotika. Molekularni doking na receptore CAT1 i CAT3 je potvrdio njihovu specifičnu interakciju sa hloramfenikolom, usled viših vrednosti afiniteta vezivanja u odnosu na tetraciklin i streptomicin (Tabela 45). Sa druge strane mnoge komponente ulja u odnosu na ove enzime imale su isti ili veći afinitet vezivanja



Slika 42. Strukture supstanci ispitane molekularnim dokingom.



Slika 43. Ispitani targeti antibakterijske aktivnosti hloramfenikola i njegove rezistencije.

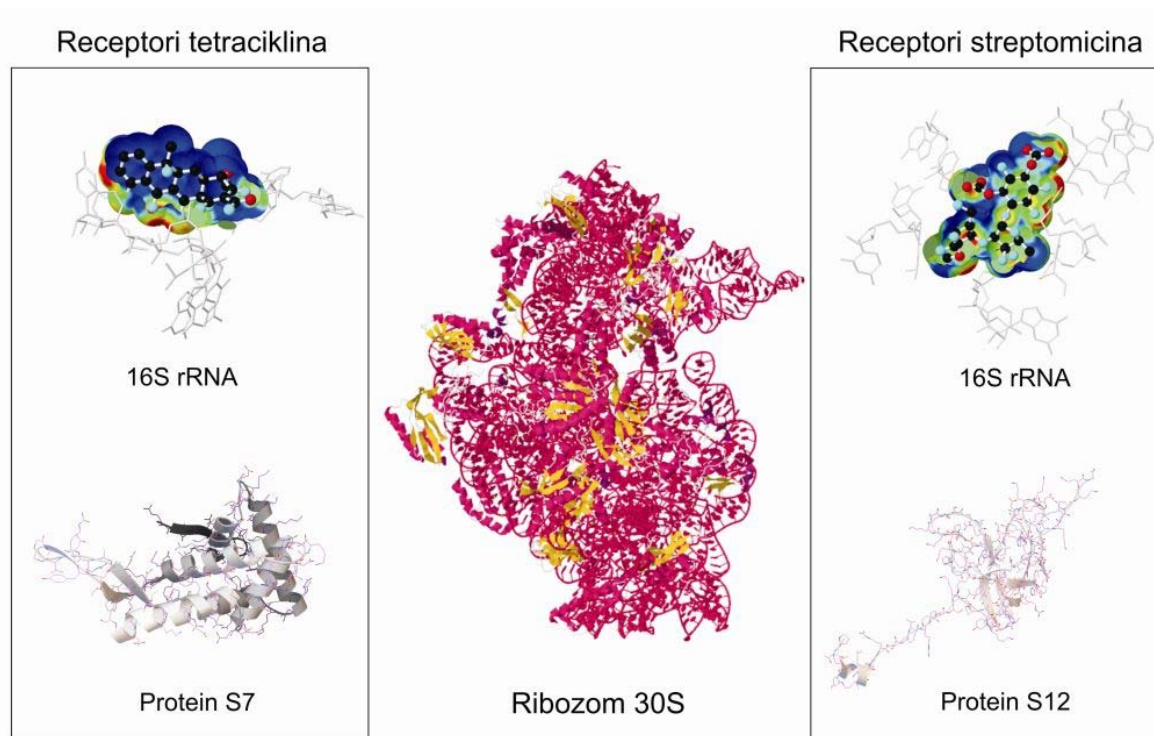
(α -bisabolol, τ -kadinol, kariofilen oksid, germakren D, β -kariofilen, β -elemen, α -kubeben, bornil acetat). Navedene komponente bi vezivanjem za CAT enzime smanjile njihovu aktivnost i sprečile inaktivaciju hloramfenikola. Objašnjenje za ovakvu pretpostavku leži u činjenici da su sve interakcije sa hloramfenikolom izrazito sinergističke. Bitno je istaći da su interakcije etarskih ulja *L. montana* (β -elemena 40.43%) i *I. graveolens* (bornil acetat 21.66%, τ -kadinol 14.60%, kariofilen oksid 9.58%) sa hloramfenikolom u 97.78% slučajeva aditivne ili sinergističke. Velika količina dostupnih komponenata, visoke MMC vrednosti supstanci i pozitivne interakcije sa CAT enzimima, mogu opravdati pozitivne interakcije ovih ulja sa hloramfenikolom. Bitno je napomenuti da je hemometrijskom analizom sinergističkog potencijala ispitanih supstanci (Slika 40), etarsko ulje *L. montana* svrstano u grupu sa najvećim sinergističkim potencijalom zajedno sa timolom i linaloolom. Međutim, dominantan sinergistički i aditivan efekat interakcija sa hloramfenikolom je uočen i kod ostalih supstanci. Izuzev etarskog ulja *T. pulegioides*, sve ispitane supstance su imale nešto niže vrednosti sinergističkog i aditivnog dejstva sa hloramfenikolom u odnosu na ulja *L. montana* i *I. graveolens*. Navedene konstatacije upućuju da je inhibicija enzima CAT samo sekundarni i pomoćni faktor pojačanja sinergističkih interakcija, a da je osnovni faktor ranije pomenuta inhibicija citohrom C oksidaze i ATP-aze.

Tabela 45. Energetski afinitet vezivanja (kcal/mol) ispitanih terpenoida i antibiotika na receptore značajnih za aktivnost i inhibiciju hloramfenikola.

Ispitane supstance i receptori	Aktivnost		Inhibicija	
	23S rRNA	Protein L16	Enzim CAT1	Enzim CAT3
Monoterpenski ugljovodonic				
Sabinen	-4.40	-5.00	-4.50	-3.70
Mircen	-3.70	-4.20	-4.10	-3.20
α -Felandren	-4.40	-5.10	-4.70	-3.70
p-Cimen	-4.30	-5.00	-4.80	-3.80
Limonen	-4.30	-4.90	-4.60	-3.70
Oksidovani monoterpeni				
Eukaliptol	-4.80	-5.50	-4.70	-3.10
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	-5.00	-5.60	-4.70	-3.30
Linalool	-4.00	-5.20	-4.00	-3.10
Borneol	-4.90	-5.50	-4.40	-3.00
Nerol	-4.30	-5.00	-4.10	-3.50
Geraniol	-4.30	-4.70	-4.20	-3.20
Bornil acetat	-5.10	-5.80	-5.10	-3.40
Geranil acetat	-4.40	-4.90	-4.80	-3.70
Seskviterpenski ugljovodonic				
α -Kubeben	-5.50	-6.20	-6.00	-4.70
β -Elemen	-4.90	-5.90	-5.50	-4.20
β -Kariofilen	-5.70	-6.40	-6.10	-4.10
Germakren D	-5.80	-6.50	-5.80	-4.40
Oksidovani seskviterpeni				
Kariofilen oksid	-5.90	-6.50	-5.90	-4.20
τ -Kadinol	-6.10	-6.40	-6.20	-4.70
α -Bisabolol	-5.40	-6.30	-5.40	-4.00
Fenolna jedinjenja				
Timol	-5.00	-5.50	-4.60	-3.70
Antibiotici				
Tetraciklin	-7.90	-8.50	-4.50	-3.80
Streptomicin	-6.80	-7.00	-4.20	-2.80
Hloramfenikol	-6.50	-6.70	-5.00	-4.00

4.8.2. Molekularni doking na receptore antibakterijske aktivnosti teraciklina i streptomicina

Pristup molekularnog dokinga primenjen je i na važne receptore antibakterijske aktivnosti tetraciklina i streptomicina. Ispitani targeti molekularnog dokinga važnih za teraciklin i streptomicin, prikazani su na Slici 44. Za razliku od hloramfenikola, istraživanja mehanizma delovanja tetraciklina i streptomicina su pokazala da ovi antibiotici inhibiraju sintezu proteina usled vezivanja za 30S subjedinicu ribozoma (Anderson et al., 2012).



Slika 44. Ispitani targeti anibakterijske aktivnosti tetraciklina i streptomicina.

Ustanovljeno je da tetraciklin svoje vezivanje ostvaruje sa proteinom S7 i ribozomalnom 16S rRNA čime je sprečeno vezivanja aminoacil-tRNA za A mesto ribozoma i pravilno prepoznavanja kodona na iRNA i antikodona na tRNA. Istraživanja mehanizma delovanja streptomicina su pokazala da ovaj antibiotik inhibira sintezu proteina vezivanjem za protein S12 i ribozomalnu 16S rRNA. Pored toga što inhibira ugradnju korektnne aminokiseline za dati kodon u iRNA, indukuje i pogrešno čitanje kodona što omogućava inkorporaciju neke druge aminokiseline (Anderson et al., 2012). Na osnovu jasno definisanih mesta antibakterijske aktivnosti antibiotika (16S rRNA, protein S7, protein S12) i njihovih XRD struktura (Hosaka et al., 1997; Broderson et al., 2000, Carter et al., 2000; Connell et al., 2007) primenom molekularnog dokinga želeli smo posredno istaći aktivnost ulja u okviru ćelijskog zida i citoplazmatične membrane i eliminisati njihovu moguću interakciju sa ribozomima.

Na osnovu rezultata u Tabeli 46, uočavamo znatno niže energetske afinitete vezivanja komponenata ulja u odnosu na ispitana receptorska mesta. Ova ispitivanja, slično prethodnim rezultatima molekularnog dokinga na receptore hloramfenikola, jasno ukazuju da meta dejstva etarskih ulja nisu ribozomi, već targeti citoplazmatične membrane ili ćelijskog zida bakterije.

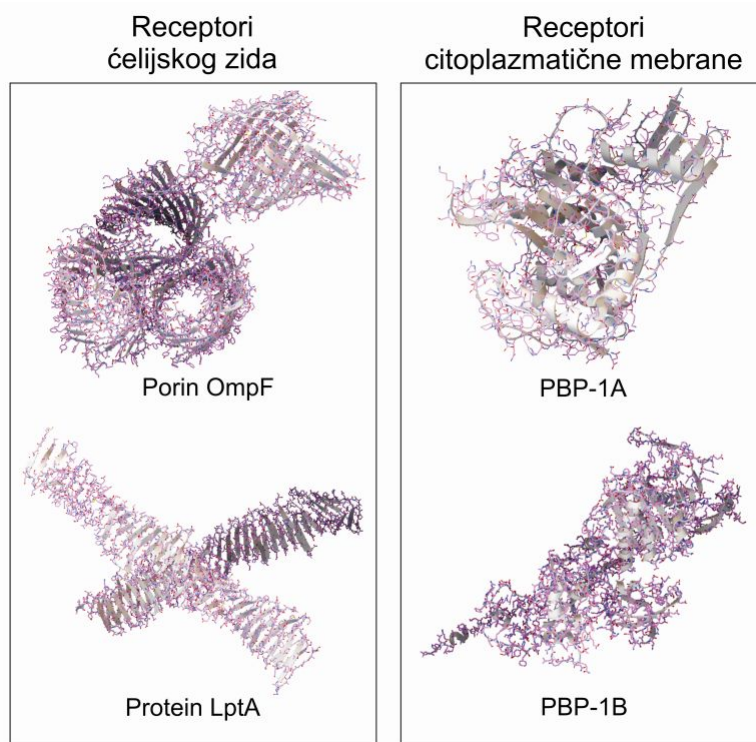
Tabela 46. Energetski afinitet vezivanja (kcal/mol) ispitanih terpenoida i antibiotika na ribozomalnim 30S receptorima za tetraciklin i streptomycin.

Ispitane supstance i receptori	Tetraciklin		Streptomycin	
	16S rRNA	Protein S7	16S rRNA	Protein S12
Monoterpeni ugljovodoni				
Sabinen	-3.00	-5.20	-3.90	-4.50
Mircen	-2.60	-4.30	-3.60	-4.20
α -Felandren	-2.90	-4.90	-4.10	-4.50
p-Cimen	-3.00	-5.00	-4.10	-4.50
Limonen	-3.00	-5.10	-4.00	-4.60
Oksidovani monoterpeni				
Eukaliptol	-3.50	-4.20	-4.10	-4.40
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	-3.80	-4.50	-4.40	-4.60
Linalool	-3.30	-4.30	-3.90	-4.10
Borneol	-3.50	-4.30	-4.00	-4.50
Nerol	-3.10	-4.10	-3.80	-4.30
Geraniol	-3.10	-4.50	-3.90	-4.10
Bornil acetat	-4.20	-4.40	-4.30	-4.60
Geranil acetat	-3.60	-4.80	-4.50	-4.50
Seskviterpeni ugljovodoni				
α -Kubeben	-3.90	-5.70	-4.90	-5.70
β -Elemen	-3.70	-5.20	-4.60	-5.00
β -Kariofilen	-4.00	-4.90	-4.80	-5.50
Germakren D	-3.60	-4.90	-5.00	-5.40
Oksidovani seskviterpeni				
Kariofilen oksid	-4.10	-5.00	-5.00	-5.60
τ -Kadinol	-4.20	-5.30	-5.60	-5.50
α -Bisabolol	-4.20	-5.40	-5.30	-5.60
Fenolna jedinjenja				
Timol	-3.60	-5.20	-4.40	-5.00
Antibiotici				
Tetraciklin	-6.80	-6.00	-7.10	-6.60
Streptomycin	-6.10	-5.90	-7.00	-6.10
Hloramfenikol	-5.10	-5.80	-5.70	-5.90

4.8.3. Molekularni doking na važne receptore ćelijskog zida i citoplazmatične membrane

Antibakterijska aktivnost etarskih ulja se pripisuje njihovom dejstvu na nivou ćelijskog zida ili citoplazmatične membrane (Sikkema et al., 1995). Najčešće opisivan način jeste njihova akumulacija u lipidnom dvosloju koja dovodi do nespecifične izmene ćelijske membrane i njenog bušenja. U ovom poglavlju želeli smo bliže da ispitamo neke od targeta, i možda uočimo neke od važnih interakcija. Receptore koje smo ispitivali bili su: porin OmpF i

protein LptA na ćelijskom zidu i proteini PBP-1A i PBP-1B na citoplazmatičnoj membrani. Strukture ovih targeta dati su na Slici 45.



Slika 45. Važni receptori ćelijskog zida i citoplazmatične membrane.

Porini su grupa kiselih proteina, koji formiraju hidrofilne pore kroz hidrofobni lipidni dvosloj spoljne membrane Gram-negativnih bakterija, kroz koje mogu nespecifično difundovati mali hidrofilni molekuli. Istraživanja su pokazala da hidrofobni hloramfenikol upravo koristi porine za transport kroz spoljnu membranu i dolazak do periplazmatičnog prostora (Anderson et al., 2012). Određeni energetske afiniteti komponenata ulja sa porinima i ostalim targetima membrane i ćelijskog zida (Tabela 47), mogli bi nam pomoći u boljem sagledavanju mehanizma njihovog dejstva.

Molekularnim dokingom je određena energija vezivanja hloramfenikola (-6.20 kcal/mol) za porin OmpF. Na osnovu rezultata u Tabeli 47, uočavamo da mnogi seskviterpeni imaju veće afinitete vezivanja za porine u odnosu na hloramfenikol. Ovo je veoma ohrabrujuće, jer ukazuje na moguć transport jako hidrofobnih komponenata etarskih ulja preko porina do ostalih targeta citoplazmatične membrane. Sa druge strane, prvi put imamo veće afinitete vezivanja komponenata za receptore u odnosu na antibiotike, što nam govori približnije o mestu njihovog dejstva.

Lipopolisaharidi su jedne od glavnih komponenata ćelijskog zida (Slika 1), odgovorne za očuvanje integriteta bakterije i zaštite od bilo kakvog neželjenog hemijskog uticaja.

Tabela 47. Energetski afinitet vezivanja (kcal/mol) ispitanih terpenoida na važne receptore ćelijskog zida i citoplazmatične membrane.

Ispitane supstance i receptori	Ćelijski zid		Citoplazmatična membrana	
	Porin OmpF	Protein LptA	Protein PBP-1A	Protein PBP-1B
Monoterpeni ugljovodoni				
Sabinen	-5.70	-4.90	-5.10	-5.90
Mircen	-5.20	-3.80	-4.50	-5.40
α -Felandren	-5.90	-5.50	-5.50	-6.30
p-Cimen	-6.10	-5.70	-5.40	-6.30
Limonen	-5.80	-5.50	-5.30	-6.10
Oksidovani monoterpeni				
Eukaliptol	-5.40	-4.50	-5.20	-5.80
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	-5.00	-5.20	-5.60	-6.10
Linalool	-4.50	-4.00	-4.80	-5.10
Borneol	-5.50	-4.70	-5.20	-5.50
Nerol	-4.80	-4.90	-5.10	-5.40
Geraniol	-5.10	-4.70	-4.70	-5.70
Bornil acetat	-5.70	-4.80	-5.70	-5.90
Geranil acetat	-5.00	-4.60	-5.20	-5.90
Seskviterpeni ugljovodoni				
α -Kubeben	-7.00	-5.90	-6.50	-7.40
β -Elemen	-6.40	-5.30	-6.00	-6.40
β -Kariofilen	-7.40	-6.00	-6.70	-6.70
Germakren D	-6.90	-5.60	-6.50	-6.90
Oksidovani seskviterpeni				
Kariofilen oksid	-6.10	-5.30	-6.40	-7.10
τ -Kadinol	-6.90	-6.40	-6.70	-7.00
α -Bisabolol	-6.80	-6.00	-6.50	-6.30
Fenolna jedinjenja				
Timol	-5.50	-5.60	-5.60	-5.90

Lipopolisaharidi povećavaju negativno naelektrisanje spoljne membrane, čineći je nepropustljivom za difuziju mnogih hidrofobnih molekula. Kako su ispitani molekuli etarskih ulja hidrofobniji u odnosu na ispitane antibiotike ($\log P_{o/w}$ komponenata $>$ $\log P_{o/w}$ antibiotika, Tabela 44), možemo zaključiti da je spoljna membrana ćelijskog zida delom odgovorna za veću rezistentnost Gram negativnih bakterija prema etarskim uljima i njihovim komponentama u odnosu na ispitane antibiotike (Tabele 17-21). Sa druge strane na osnovu hemometrijske analize stepena smanjenja MIC vrednosti (Tabela 43 i Slika 41), uočavamo izdvajanje Gram-pozitivne bakterije (*S. aureus* ATCC 29213) u odnosu na ostale Gram-negativne bakterije. Ovo nam govori o uticaju spoljne membrane i ulozi lipopolisaharida na

povišenu rezistentnost Gram negativnih bakterija. Kako su rezultati kombinovanih interakcija uglavnom bili sinergističke i aditivne prirode, pretpostavili smo da ulja mogu na neki način ometati sintezu lipopolisaharida i povećati prodornost antibiotika do njihovih targeta u citoplazmi. U potrazi za odgovorom kombinovanog dejstva etarskih ulja i antibiotika, metodom molekularnog dokinga ispitan je LptA protein (Slika 45). LptA je esencijalan periplazmatični protein važan u transportu lipopolisaharida iz citoplazmatične ka spoljnoj membrani Gram negativnih bakterija (Suits et al., 2008). Njegova inhibicija određenim komponentama ulja mogla bi objasniti smanjenu rezistentnost Gram-negativnih bakterija na antibiotike i sinergističke efekte ispitanih smeša. I pored jasno definisanog antibakterijskog dejstva streptomicina na 30S ribozom, molekularnim dokingom smo odredili afinitet njegovog vezivanja za LptA protein (-6.60 kcal/mol) što će nam koristiti kao referentna tačka u odnosu na koju ćemo posmatrati energije vezivanja komponenata ulja. Na osnovu afiniteta vezivanja, uočavamo nešto višu vrednost vezivanja streptomicina za LptA protein u odnosu na S12 protein (Tabela 46), što opravdava njegovo ispitivanje kao mogućeg inhibitora vezivanja lipopolisaharida za spoljni deo membrane (Neter et al., 1958). Međutim, najnovija istraživanja su ipak pokazala da streptomycin nije dobar inhibitor lipopolisaharida, usled njegove polikatjonske strukture, tendencije vezivanja za spoljni negativni deo membrane i slabog prodiranja u ćeliju (Anderson et al., 2012, Hobbs et al., 2013). Hloramfenikol i tetraciklin nemaju polikatjonsku strukturu za razliku od streptomicina, što opravdava njihovu višu akumulaciju i više MMC vrednosti u membrani a što je delom i odgovorno za bolje rezultate kombinovanog dejstva ovih antibiotika sa uljima. Na osnovu rezultata molekularnog dokinga na LptA protein (Tabela 47), uočavamo da sve ispitane komponente etarskih ulja imaju manje afinitete vezivanja u odnosu na streptomycin, što nas navodi na pretpostavku da etarska ulja i njihove komponente ne interferiraju sa prenošenjem lipopolisaharida i da se destrukcija ćelijskog zida i citoplazmatične membrane odigrava drugačijim mehanizmom.

Pojedine studije su elektronskom mikroskopijom pokazale, da etarska ulja dovode do nepravilnih morfoloških promena u bakteriji, u vidu izduživanja ćelije (filamentozni rast), čija je posledica liza ćelije (Turgis et al., 2009). Slično dejstvo jeste karakteristika β -laktamskih antibiotika, tačnije penicilina, koji se vezuje za specifične proteina koji su locirani na citoplazmatičnoj membrani (PBP). Postoje više vrsta PBP proteina, međutim mi smo se u ovoj studiji koncentrisali na PBP-1A i PBP-1B koji su esencijalni za rast i funkcionisanje bakterije (Anderson et al., 2012). Pokazano je da su ovi proteini glavni kontrolori izduživanja ćelije i da su odgovorni za umrežavanje peptidoglikana u ćelijskom zidu. Molekularnim dokingom određeni su afiniteti vezivanja četiri vrste penicilina (penicilin G, penicilin X,

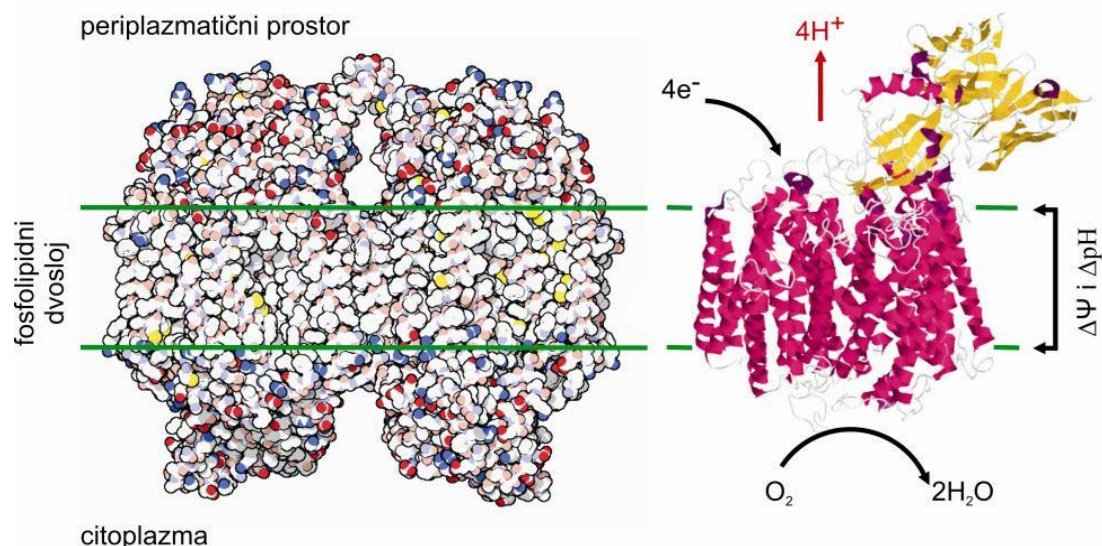
penicilin V i penicilin N) u odnosu na targete PBP-1A i PBP-1B (Contreras-Martel et al., 2005; Sung et al., 2009). Ove vrednosti će nam služiti kao referentna tačka u odnosu na koje ćemo proceniti da li pojedine komponente mogu imati sličan efekat kao penicilini. Afiniteti vezivanja penicilina za PBP-1A target su sledeći: penicilin G (-7.0 kcal/mol), penicilin X (-7.2 kcal/mol), penicilin V (-7.7 kcal/mol) i penicilin N (-6.2 kcal/mol). Molekularnim dokingom ispitani su afiniteti vezivanja penicilina i za PBP-1B protein: penicilin G (-7.6 kcal/mol), penicilin X (-7.9 kcal/mol), penicilin V (-7.3 kcal/mol) i penicilin N (-7.2 kcal/mol). Na osnovu rezultata u Tabeli 47, uočavamo da naročito ispitani seskviterpeni imaju uporedive vrednosti afiniteta sa penicilinima. Ovo je naročito izraženo u slučaju dejstva penicilina N na PBP-1A protein gde možemo uočiti mnoge seskviterpene sa višim vrednostima afiniteta vezivanja (α -kubeben, β -kariofilen, germakren D, kariofilen oksid, τ -kadinol, α -bisabolol). Uporedive i više vrednosti vezivanja komponenata ulja u odnosu na peniciline opravdavaju eksperimentalno utvrđene činjenice u vezi uticaja etarskih ulja na morfološke promene bakterija (Turgis et al., 2009). Rezultati molekularnog dokinga na PBP-1A i PBP-1B upućuju da etarska ulja i njihove seskviterpenske komponente, mogu uticati na slabljenje ćelijskog zida i lakšu dostupnost antibiotika ribozomima. Međutim, rezultati na ovim targetima ne mogu objasniti različitu zastupljenost sinergističkih, aditivnih i antagonističkih interakcija između hloramfenikola, tetraciklina i streptomicina. Sve ovo upućuje, da membranski potencijal i energetski faktor ulaska antibiotika u citoplazmu uslovljava zastupljenost određene vrste interakcija. Na osnovu ove konstatacije ispitaćemo molekule odgovorne za membranski potencijal citoplazmatične membrane.

4.8.4. Molekularni doking na citohrom C oksidazu i ATP-sintazu

Ulazak streptomicina u citoplazmu ćelije je energetski zavistan, za razliku od tetraciklina i hloramfenikola čiji je ulazak delimično ili totalno nezavistan od membranskog potencijala. U ovoj studiji, najlošiji rezultati antibakterijske aktivnosti kombinovane primene ispitanih supstanci i antibiotika su postignuti sa streptomicinom a najbolji sa hloramfenikolom. Sve ovo upućuje da su enzimi citoplazmatične membrane, citohrom C oksidaza i ATP-aza, glavni targeti antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i njihovih komponenata.

Citohrom C oksidaza je transmembranski protein citoplazmatične membrane, koji je važna komponenta elektron transportnog lanaca. Kao sastavni deo elektron transportnog lanca, primanjem četiri elektrona od molekula citohroma C, vrši redukciju jednog molekula kiseonika u dva molekula vode, pri tome trošeći osam protona iz citoplazme (četiri u obliku vode i četiri koji ovim procesom odlaze u periplazmatičan prostor). Pokazano je da je ovaj enzim odgovoran za formiranje protonskog gradijenta (ΔpH) i membranskog potencijal ($\Delta \psi$).

Šematski prikaz strukture citohrom C oksidaze i proces formiranja protonskog i membranskog gradijenta dat je na Slici 46. Kao što je već napomenuto u odeljku antibakterijske aktivnosti terpenoida, važan mehanizam antibakterijske aktivnosti supstanci jeste razaranje energetskog statusa ćelije. Eksperimenti tetralina sa citohrom C oksidazom su pokazali smanjenje protonskog gradijenta (ΔpH) za 80% i membranskog potencijal ($\Delta\psi$) za 50% (Sikkema et al., 1994). U istoj studiji je pokazano da različite supstance, slične membranske koncentracije ($\log P_{m/b}$) ispoljavaju sličan efekat. Molekularnim dokingom smo ispitali strukturu citohrom C oksidaze (Harrenga & Michel, 1999) i došli do vrlo važnih saznanja. Molekularnim modelovanjem smo pokazali da sve ispitane supstance imaju više vrednosti afiniteta vezivanja za citohrom C oksidazu nego za prethodno diskutovane targete citoplazme, ćelijskog zida i citoplazmatične membrane (Tabele 45-48).



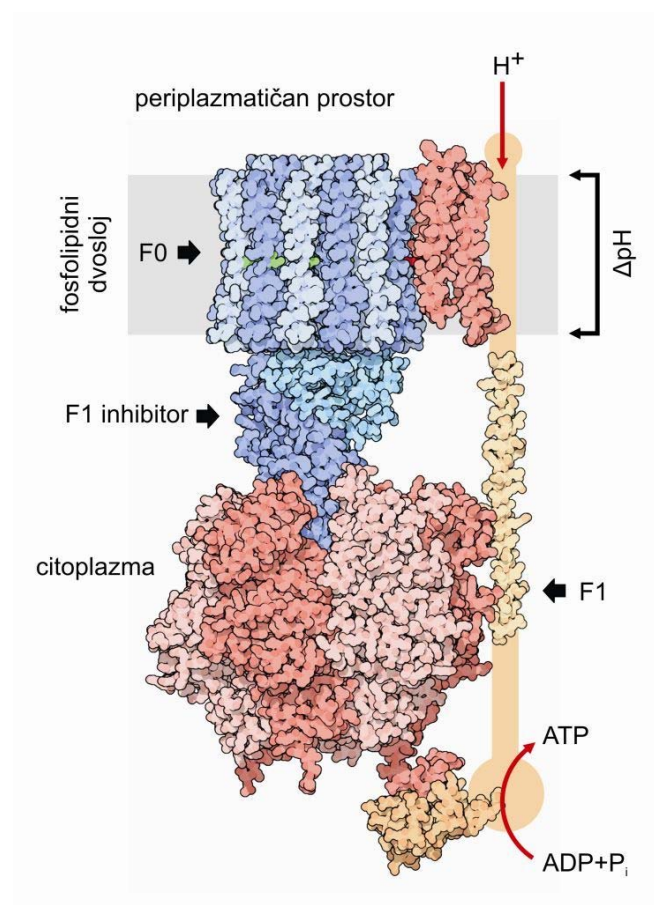
Slika 46. Citohrom C oksidaza i nastanak membranskog ($\Delta\psi$) i protonskog gradijenta (ΔpH). Afinitet vezivanja komponenata ulja za ovaj receptor je viši u odnosu na ispitane antibiotike (Tabela 48), a takođe je pokazano da pojedine komponente ulja imaju i više vrednosti vezivanja u odnosu na antimicin (-7.2 kcal/mol), antibiotik koji svoju antibakterijsku aktivnost ostvaruje inhibicijom Citohroma C (Van Der Plas et al., 1976). Vezivanje komponenata etarskih ulja za citohrom C oksidazu, dovodi do konformacionih promena, što se manifestuje razaranjem membranskog i pH gradijenta koji je neophodan za ulazak streptomcina u citoplazmu. Nedovoljna količina energije uzrokuje i lošije rezultate kombinovane interakcije supstanci sa streptomcinom u odnosu na tetraciklin i hloramfenikol čiji je ulazak u citoplazmu delimično ili totalno nezavistan od membranskog potencijala.

Tabela 48. Energetski afinitet vezivanja (kcal/mol) ispitanih terpenoida i antibiotika na citohrom C oksidazu i ATP sintazu.

Ispitane supstance i receptori	Citoplazmatična membrana	
	Citohrom C oksidaza	ATP sintaza F ₀
Monoterpenski ugljovodonici		
Sabinen	-6.20	-6.30
Mircen	-5.50	-6.40
α -Felandren	-6.80	-6.90
p-Cimen	-6.60	-6.90
Limonen	-6.60	-6.40
Oksidovani monoterpeni		
Eukaliptol	-6.10	-6.10
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	-6.20	-6.50
Linalool	-5.20	-5.80
Borneol	-5.70	-6.10
Nerol	-5.40	-5.40
Geraniol	-5.60	-5.60
Bornil acetat	-6.50	-6.90
Geranil acetat	-6.60	-5.80
Seskviterpenski ugljovodonici		
α -Kubeben	-8.40	-7.40
β -Elemen	-7.40	-6.50
β -Kariofilen	-7.70	-6.60
Germakren D	-7.80	-7.30
Oksidovani seskviterpeni		
Kariofilen oksid	-7.40	-6.30
τ -Kadinol	-8.50	-7.60
α -Bisabolol	-7.70	-7.60
Fenolna jedinjenja		
Timol	-6.50	-6.70
Antibiotici		
Tetraciklin	-5.00	-5.20
Streptomycin	-4.10	-4.20
Hloramfenikol	-4.30	-4.60

Protonski gradijent (ΔpH), formiran pravilnim funkcionisanjem elektron transportnog sistema, odgovoran je za rad ATP-sintaze, enzima koji je uključen u biosintezi najvažnijeg energetskog molekula živih sistema ATP-a, u procesu oksidativne fosforilacije. Za aktivnost ovog enzima potrebna je translokacija protona kroz sam enzim. ATP sintaza je smeštena u citoplazmatičnoj membrani i kao što možemo videti tesno je povezana sa respiratornim lancem. ATP sintaza sastoji se od dve funkcionalane jedinice F₁ i F₀, koje su međusobno

povezane F1-inhibitorom (Slika 47). Transmembranski protein F0 je hidrofobna komponenta ATP sintaze, koja formira kanal za translokaciju protona do hidrofilnog citoplazmatskog F1 proteina u kome se vrši sinteza ATP-a iz ADP-a. Inhibiranje elektron transportnog lanca komponentama ulja, vodi do razaranja protonskog gradijenta ćelije a time utiče i na inhibiranje ATP sintaze, stvaranje ATP-a i smrti ćelije. Smanjenje protonskog gradijenta (ΔpH) nije jedini uzrok smanjenja energetskog statusa i membranskog potencijala ćelije. Pokazano je da supstance inhibiraju nastanak ATP-a usled parcijalne inhibicije enzima ATP-aze i proteina uključenih u procesu prenosa energije (Uribe et al., 1990). Pojedine studije su pokazale da karvakrol u koncentraciji od 2mM ili 1mM posle 10 do 14 minuta eliminiše sadržaj ATP-a u citoplazmi (Ultee et al., 1999). Dejstvom pojedinih etarskih ulja na različite bakterije uočeno je značajno smanjenja ATP-a u citoplazmi (Caillet & Lacroix, 2006; Caillet et al., 2009). Rezultati kombinovanih interakcija antibiotika i supstanci naveli su nas da ispitamo direktno vezivanje komponentata za ATP sintazu (Rastogi & Girvin, 1999). Slično citohrom C oksidazi, uočavamo znatno više vrednosti afiniteta vezivanja komponentata za ATP-sintazu nego za prethodno diskutovane targete citoplazme, ćelijskog zida i citoplazmatske membrane (Tabele 45-48). Afinitet vezivanja komponentata ulja za ovaj



Slika 47. Šematski prikaz ATP-aze i odgovarajući mehanizma nastajanja ATP molekula.

receptor je viši u odnosu na ispitane antibiotike (Tabela 48), čiji mehanizam i nije zasnovan na ovim receptorima. Antibiotici grupe oligomicina, svoju antibakterijsku aktivnost ostvaruju upravo inhibicijom ATP-sintaze. Molekularnim dokingom želeli smo proceniti koliko je stvarno jaka inhibicija ATP-sintaze komponentama ulja u odnosu na oligomicin.

Tabela 49. Energetski afinitet vezivanja (kcal/mol) ispitanih supstanci i antibiotika.

Ispitane supstance	Antibiotici		
	Tetraciklin	Streptomycin	Hloramfenikol
Monoterpenski ugljovodonici			
Sabinen	-1.90	-1.90	-1.80
Mircen	-2.50	-1.70	-2.00
α -Felandren	-2.40	-2.00	-2.30
p-Cimen	-2.40	-2.00	-2.30
Limonen	-2.10	-2.00	-2.20
Oksidovani monoterpeni			
Eukaliptol	-1.50	-1.90	-1.10
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	-2.30	-2.20	-1.60
Linalool	-1.30	-1.70	-2.00
Borneol	1.30	-1.90	1.40
Nerol	-2.10	-2.30	-2.30
Geraniol	-2.50	-1.90	-2.10
Bornil acetat	1.60	-2.00	2.00
Geranil acetat	-2.10	-2.50	-1.90
Seskviterpenski ugljovodonici			
α -Kubeben	2.10	-2.40	-1.60
β -Elemen	1.80	-2.10	-1.30
β -Kariofilen	11.50	-1.90	0.80
Germakren D	13.10	-1.70	-1.30
Oksidovani seskviterpeni			
Kariofilen oksid	12.30	-1.80	5.70
τ -Kadinol	3.80	-2.20	-2.00
α -Bisabolol	-0.40	-2.10	-1.80
Fenolna jedinjenja			
Timol	-2.50	-2.30	-2.00

Implementacijom SAR metode, određeni su afiniteti vezivanja tri vrste oligomicina (oligomicin A, oligomicin B i oligomicin C) u odnosu na target ATP-sintazu (F₀ protein). Ove vrednosti će nam služiti kao referentna tačka u odnosu na koje ćemo proceniti da li pojedine komponente mogu imati sličan efekat kao oligomicini. Afiniteti vezivanja oligomicina za ATP-sintazu su sledeći: oligomicin A (-14.8 kcal/mol), oligomicin B (-14.7 kcal/mol) i oligomicin C (-14.9 kcal/mol).

Na osnovu rezultata u Tabeli 48, uočavamo da ispitane supstance i pored većeg afiniteta vezivanja za ATP-azu, imaju mnogo manji afinitet u odnosu na specijalizovane antibiotike ATP-azne inhibicije. I pored većeg afiniteta vezivanja monoterpena za ATP-sintazu (Tabela 48), možemo konstatovati da inhibicija citohrom C oksidaze više doprinosi antibakterijskoj aktivnosti etarskih ulja. Potvrda za ovu konstataciju jeste poređenje afiniteta komponenata i specijalizovanih antibiotika (antimicina i oligomicina) na ovim targetima, kao i ranija konstatacija da transport elektrona na ATP u fosforilaciji na nivou supstrata je neefikasan izvor energije za transport aminoglikozida (Anderson et al., 2012).

Molekularnim dokingom ispitanih supstanci na antibiotike određeni su i energetski afiniteti njihovog vezivanja (Tabela 49). Na osnovu rezultata (Tabele 45-49) možemo uočiti znatno niže vrednosti afiniteta komponenata prema antibioticima, u odnosu na opisana receptorska mesta citoplazme, ćelijskog zida i citoplazmatične membrane. Ovi rezultati su potvrda da na nivou ćelije, primenjene smeše ulja i antibiotika deluje totalno nezavisno i da je eventualna modifikacija ispitanih antibiotika nemoguća.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije izvršena su detaljna hemijska, mikrobiološka i hemometrijska ispitivanja zemljišta, etarskih ulja i njihovih glavnih komponenta, izolovanih iz osam biljnih vrsta, koje su sakupljene na šest lokaliteta Republike Srbije (*Thymus glabrescens* Willd., *Thymus pulegioides* L., *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., *Nepeta nuda* L., *Libanotis montana*, *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit., *Peucedanum officinale* L. i *Inula graveolens* L.).

Na osnovu kompletne hemijske, mineraloške i hemometrijske analize zemljišta možemo uočiti da: a) koncentracije metala u zemljištima se nalaze u okviru njihovih utvrđenih koncentracija u Zemljinoj kori, b) postoji snažan uticaj karbonatne frakcije zemljišta na biodostupnost metala, c) na osnovu hemometrijske analize zemljišta su podeljena na dve grupe. Karakteristika zemljišta svrstana u grupu A, (Kravlje i Sićevačke klisura) je izuzetno visok sadržaj kalcijuma. Grupa B je podeljena u dve podgrupe. Zemljište sa planine Vidlič, nosilac podgrupe B₁, karakterisalo se višim vrednostima za sadržaje Fe, Cu i Zn. Podgrupa B₂, zemljišta sa Stare i Suve Planine, odlikovala su se visokim sadržajem Na, K i Mn, d) na osnovu XRD analize mineralnog sastava zemljišta uočava se dominantno prisustvo kvarca u svim uzorcima. Takođe je većina zemljišta sadržala i izvesnu količinu glinenih minerala, e) hemometrijska analiza mineralnog sastava je podelila zemljišta na dve grupe. Grupa A, zemljište sa područja Stare Planine, odlikuje se izraženim sadržajem kvarca, dok je u okviru zemljišta grupe B, konstatovana sličnost Kravlja i Sićevačke klisure, usled izraženog sadržaja kalcita, f) ustanovljena je korelacija između pojedinih hemijskih parametara zemljišta (pH, Eh, CEC, EC, organska materija).

Akumulacija ispitivanih metala u odabranim biljkama ukazuje da: a) sadržaj elemenata je u okviru utvrđenih koncentracija za samonikle lekovite biljke, b) hemometrijska analiza je identifikovala dve grupe biljaka. Grupa A, kojoj pripada najveći broj ispitanih biljnih vrsta, odlikovala se višim sadržajem Ca, Mg, Na, Fe i nižim sadržajem K i Mn u odnosu na biljne vrste grupe B, c) na osnovu Eh-pH dijagrama je ustanovljena biodostupnost redukovanih oblika ispitivanih elemenata, d) sadržaj metala u biljnim vrstama je uslovljen kombinovanim uticajem genetskih faktora, kao i mineraloškom i hemijskom kompozicijom odgovarajućih zemljišta, e) postoji tolerantnost pojedinih biljaka prema povećanom sadržaju metala, f) sadržaj hemijskih elemenata u analiziranom biljnom materijalu je potvrda da ispitane biljne vrste mogu imati nutritivan značaj i biti izvor neophodnih elemenata, važnih za optimalno funkcionisanje ljudskog organizma.

Na osnovu hemijskog sastava ispitanih etarskih ulja i hemometrijske analize, pokazano je da biljne vrste u okviru istog roda mogu, ali i ne moraju imati sličan hemijski sastav. Osim

genetske predispozicije biljne vrste, edafski uslovi sredine i faza vegetacije utiču na različiti hemijski sastav ulja. Ovo će biti još izraženije ukoliko se radi o biljnim vrstama različitih rodova, odnosno familija.

Razmatrajući antibakterijsku aktivnost svih proučavanih supstanci, najjaču bakteriostatičku i baktericidnu aktivnost ispoljili su antibiotici i etarska ulja roda *Thymus*, kao i njihove glavne komponente. Sve ove supstance su svrstane u okviru zasebne grupe, primenom hemometrijske PCA i HCA analize.

Utvrdeno je da većina etarskih ulja, u kombinaciji sa antibioticima ispoljavaju dominantna i vrlo jaka sinergistička dejstva. Takođe uočavamo i da mnoge čiste supstance, glavne komponente etarskih ulja, tipa timola i linaloola, pokazuju izvanredna sinergistička dejstva sa određenim antibioticima. S druge strane konstatovane su i antagonističke interakcije ulja *N. nuda* i njene glavne komponente eukaliptola sa antibioticima.

Na osnovu analiziranih interakcija supstanci sa antibioticima, možemo uočiti dominantan sinergizam sa hloramfenikolom, aditivne interakcije sa tetraciklinom i dominantan antagonizam sa streptomycinom. Zabeležene su jake antagonističke interakcije ispitanih supstanci sa streptomycinom na sojevima *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853. Na osnovu pojačanja antibakterijske aktivnosti antibiotika u kombinaciji sa ispitanim supstancama, izdvaja se ponašanje Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* ATCC 29213, u odnosu na ostale korišćene sojeve.

Pokazano je da čiste supstance koje nemaju antibakterijsku aktivnost (geranil acetat i limonen) u znatnoj meri mogu povećati aktivnost antibiotika na ispitanim sojevima, pri čemu je utvrđeno da ove komponente nemaju uticaj na aktivnost monoterpenoida, ili je njihov uticaj neznatan.

Na osnovu međusobne interakcije monoterpenoida etarskih ulja, izuzev eukaliptola, uočavamo dominantnu pojavu aditivnih interakcija. Takođe je, njihovom međusobnom kombinacijom, dokazan različit doprinos sinergističkim, aditivnim i antagonističkim interakcijama.

Etarska ulja koja ne poseduju značajan antibakterijski potencijal (izolovana iz *Libanotis montana*, *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit. i *Peucedanum officinale* L), u kombinaciji sa odgovarajućim antibiotikom ispoljavaju signifikantan sinergistički efekat i značajno smanjuju njegovu terapijsku dozu.

Eksperimentalni rezultati ove doktorske disertacije i hemometrijska analiza nedvosmisleno ukazuju da je antibakterijska aktivnost ispitanih etarskih ulja i glavnih komponentata uslovljena njihovim membranskim koncentracijama i da je usmerena na razaranje protonskog

gradijenta i membranskog potencijala citoplazmatične membrane. Primenom molekularnog dokinga na definisana ciljna mesta antibiotika, ćelijskog zida i citoplazmatične membrane objasnili smo i potvrdili uočene indikacije eksperimentalnih rezultata.

Pokazano je da je visoka membranska koncentracija antibiotika povoljna u uslovima nastanka nespecifične izmene membrane i njene lize, dejstvom komponenata etarskog ulja, pri čemu antibiotik najviših koncentracija najlakše ostvaruje svoju aktivnost na ribozomu. Ovde nikako ne treba izostaviti energetski uslov ulaska antibiotika u citoplazmu, jer samo zajedničko razmatranje ova dva faktora može objasniti uočene pojave i mehanizam dejstva ispitanih kombinacija.

Rezultati proučavanja antibakterijske aktivnosti etarskih ulja odabranih biljnih vrsta potvrđuju opravdanost njihove primene u tradicionalnoj i oficijalnoj medicini. Istovremeno je ukazano na potencijalnu primenu dobijenih rezultata u procesu proizvodnje i primene antibakterijskih preparata, posebno u tretmanu rezistentnih sojeva.

Korišćene metode hemometrijske analize jednoznačno ukazuju na neophodnost njihove aplikacije u savremenim hemijskim i biološkim istraživanjima.

6. LITERATURA

- Adaikpoh, E.O., Kaizer, A.N., 2012. Trace metal enrichment in sediments from otofure and tebogawaste dump sites in Benin City, Nigeria. *International Journal of Chemistry*, **4**, 14-27.
- Adams, R.P., 2007. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, pp. 804.
- Adaszyńska, M., Swarcewicz, M., Dzięciol, M., Dobrowolskab, A., 2013. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of lavender varieties from Poland. *Natural Product Research*, **27**, 1497-1501.
- Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., 2013. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **48**, 80-86.
- Al-Fartosy, A.J.M., 2011. Antioxidant properties of methanolic extract from *Inula graveolens* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **35**, 591-596.
- Ammar, A.H., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Romdhane, M., Zagrouba, F., 2012. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. flowers essential oil (Neroli oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **15**, 1034-1040.
- Amtmann, A., Sanders, D., 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research*, **29**, 75-112.
- Anderson, R.J., Groundwater, P.W., Todd, A., Worsley, A.J., 2012. *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, pp. 378.
- Anschütz, U., Becker, D., Shabala, S., 2014. Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *Journal of Plant Physiology*, **171**, 670-687.
- Aprotosoai, A.C., Hăncianu, M., Costache, I.I., Miron, A., 2014. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, **in press**, DOI: 10.1002/ffj.3197.
- Argast, M., Beck, C.F., 1984. Tetracycline diffusion through phospholipid bilayers and binding to phospholipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **26**, 263-265.
- Arumugam, R., Kannan, R.R.R., Jayalakshmi, J., Manivannan, K., Devi, G.K., Anantharaman, P., 2012. Determination of element contents in herbal drugs: chemometric approach. *Food Chemistry*, **135**, 2372-2377.

- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M., 2013. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, **50**, 304-311.
- Barbour, A., Scaglione, F., Derendorf, H., 2010. Class-dependent relevance of tissue distribution in the interpretation of anti-infective pharmacokinetic/pharmacodynamic indices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35**, 431-438.
- Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L.C., Ilboudo, A.J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, **18**, 1070-1074.
- Beier, R.C., Allen Byrd, J., Kubena, L.F., Hume, M.E., McReynolds, J.L., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., 2014. Evaluation of linalool, a natural antimicrobial and insecticidal essential oil from basil: effects on poultry. *Poultry Science*, **93**, 267-272.
- Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Abdelkafi, S., Hamdi, N., 2013. Essential oil from *Artemisia phaeolepis*: chemical composition and antimicrobial activities. *Journal of Oleo Science*, **62**, 973-980.
- Benito, B., Haro, R., Amtmann, A., Cuin, T.A., Dreyer, I., 2014. The twins K⁺ and Na⁺ in plants. *Journal of Plant Physiology*, **171**, 723-731.
- Bennett, J.P., Chiriboga, E., Coleman, J., Waller, D.M., 2000. Heavy metals in wild rice from northern Wisconsin. *Science of the Total Environment*, **10**, 261-269.
- Beyer, W.N., Green, C.E., Beyer, M., Chaney, R.L., 2013. Phytotoxicity of zinc and manganese to seedlings grown in soil contaminated by zinc smelting. *Environmental Pollution*, **179**, 167-176.
- Biswas, T., Houghton, J.L., Garneau-Tsodikova, S., Tsodikov, O.V., 2012. The structural basis for substrate versatility of chloramphenicol acetyltransferase CATI. *Protein Science*, **21**, 520-530.
- Blanc, M.C., Muselli, A., Bradesi, P., Casanova, J., 2004. Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, **19**, 314-319.
- Bohrerova, Z., Stralkova, R., Podesvova, J., Bohrer, G., Pokorny, E., 2004. The relationship between redox potential and nitrification under different sequences of crop rotations. *Soil and Tillage Research*, **77**, 25-33.

- Borer, C.H., Hamby, M.N., Hutchinson, L.H., 2012. Plant tolerance of a high calcium environment via foliar partitioning and sequestration. *Journal of Arid Environments*, **85**, 128-131.
- Bosnić, T., Softić, D., Grujić-Vasić, J., 2006. Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils. *Acta Medica Academica*, **35**, 19-22.
- Boudouda, H.B., Kabouche, A., Aburjai, T., Kabouche, Z., 2013. GC-MS analysis of *Inula graveolens* (L.) Desf. from Algeria. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **16**, 651-654.
- Bourgou, S., Rahali, Z.F., Ourghemmi, I., Saïdani, T.M., 2012. *Scientific World Journal*, **2012**, 1-10.
- Bozari, S., Agar, G., Aksakal, O., Erturk, F.A., Yanmis, D., 2013. Determination of chemical composition and genotoxic effects of essential oil obtained from *Nepeta nuda* on *Zea mays* seedlings. *Toxicology and Industrial Health*, **29**, 339-348.
- Brady, N.C., Weil, R.R., 2010. *Elements of the nature and properties of soils, third edition*. Prentice Hall, New Jersey, pp. 624.
- Braga, P.C., 2005. Thymol: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. *Giornale Italiano di Ostetricia e Ginecologia*, **27**, 267-272.
- Brereton, R.G., 2003. *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 504.
- Broadley, M.R., White, P.J., 2010. Eats roots and leaves. Can edible horticultural crops address dietary calcium, magnesium and potassium deficiencies? *Proceedings of the Nutrition Society*, **69**, 601-612.
- Brodersen, D.E., Clemons J.W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V., 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, **103**, 1143-1154.
- Bulkley, D., Innis, C.A., Blaha, G., Steitz, T.A., 2010. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 17158-17163.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223-253.
- Caillet, S., Lacroix, M., 2006. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **69**, 2961-2969.

- Caillet, S., Ursachi, L., Shareck, F., Lacroix, M., 2009. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, **74**, 499-508.
- Carter, A.P., Clemons J.W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V., 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**, 340-348.
- Chaffai, R., Elhammadi, M.A., Seybou, T.N., 2007. Altered fatty acid profile of polar lipids in maize seedlings in response to excess copper. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **193**, 207-217.
- Chalchat, J.C., Gorunović, M.S., Maksimović, Z.A., 1999. Essential oil of *Satureja kitaibelii* Wierzb. f. *aristata* (Vand.) hayek, Lamiaceae from eastern Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, **11**, 691-692.
- Chen, H., Lu, X., Li, L.Y., Gao, T., Chang, Y., 2014. Metal contamination in campus dust of Xi'an, China: a study based on multivariate statistics and spatial distribution. *Science of the Total Environment*, **484**, 27-35.
- Chesworth, W., 2004. Redox, soil and carbon sequestration. *Edafologia*, **11**, 37-43.
- Chou, T.C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Research*, **70**, 440-446.
- Chou, T.C., Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, **22**, 27-55.
- CLSI M07-A08, 2009. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, pp. 63.
- Connell, S.R., Takemoto, C., Wilson, D.N., Wang, H., Murayama, K., Terada, T., Shirouzu, M., Rost, M., Schuler, M., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Mielke, T., Fucini, P., Yokoyama, S., Spahn, C.M., 2007. Structural basis for interaction of the ribosome with the switch regions of GTP-bound elongation factors. *Molecular Cell*, **25**, 751-764.
- Contreras-Martel, C., Job, V., Di Guilmi, A.M., Vernet, T., Dideberg, O., Dessen, A., 2006. Crystal structure of penicillin-binding protein 1A (PBP1A) reveals a mutational hotspot implicated in beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*, **355**, 684-696.
- Davidovich, C., Bashan, A., Yonath, A., 2008. Structural basis for cross-resistance to ribosomal PTC antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 20665-20670.

- de Bont, J.A.M., 1998. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, **16**, 493-499.
- De Martino, L., Bruno, M., Formisano, C., De Feo, V., Napolitano, F., Rosselli, S., Senatore, F., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Thymus* growing wild in southern Italy. *Molecules*, **14**, 4614-4624.
- Demidchik, V., 2014. Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells. *Journal of Plant Physiology*, **171**, 696-707.
- Din, W.M., Jin, K.T., Ramli, R., Khaithir, T.M.N., Wiart, C., 2013. Antibacterial effects of ellagitannins from *Acalypha wilkesiana* var. *macafeana* hort.: surface morphology analysis with environmental scanning electron microscopy and synergy with antibiotics. *Phytotherapy Research*, **27**, 1313-1320.
- Djenane, D., Yangüela, J., Gómez, D., Roncalés, P., 2012. Perspectives on the use of essential oils as antimicrobials against *Campylobacter jejuni* CECT 7572 in retail chicken meats packaged in microaerobic atmosphere. *Journal of Food Safety*, **32**, 37-47.
- Dohi, S., Terasaki, M., Makino, M., 2009. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 4313-4318.
- Dougherty, P.F., Yotter, D.W., Matthews, T.R., 1977. Microdilution transfer plate technique for determining *in vitro* synergy of antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **11**, 225-228.
- Duarte, M.C.T., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M., Sartoratto, A., 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, 197-201.
- Ebrahim, A.M., Eltayeb, M.H., Khalid, H., Mohamed, H., Abdalla, W., Grill, P., Michalke, B., 2012. Study on selected trace elements and heavy metals in some popular medicinal plants from Sudan. *Journal of Natural Medicines*, **66**, 671-679.
- El-Baky, H.H.A., El-Baroty, G.S., 2008. Chemical and biological evaluation of the essential oil of Egyptian Moldavian balm. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, **2**, 76-81.
- Elec, V., Quimio, C.A., Mendoza, R., Sajise, A.G.C., Beebout, S.E.J., Gregorio, G.B., Singh, R.K., 2013. Maintaining elevated Fe²⁺ concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, **372**, 253-264.

- En, Z., Vasidov, A., Tshipin, V.V., Tillaev, T., Jumaniyazova, G.I., 2003. Study of element uptake in plants from the soil to assess environmental contamination by toxic elements. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research-Section A*, **505**, 462-465.
- Eryiğit, T., Okut, N., Ekici, K., Yildirim, B., 2014. Chemical composition and antibacterial activities of *Juniperus horizontalis* essential oil. *Canadian Journal of Plant Science*, **94**, 323-327.
- Farjam, M.H., 2012. Antibacterial activity and composition of essential oil of *Nepeta pungens* Benth. from Iran. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2**, 103-105.
- Ferrante, A.A., Augliera, J., Lewis, K., Klibanov, A.M., 1995. Cloning of an organic solvent-resistance gene in *Escherichia coli*: the unexpected role of alkylhydroperoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7617-7621.
- Figuérédo, G., Chalchat, J.C., Petrović, S., Maksimović, Z., Gorunović, M., Boža, P., Radić, J., 2009. Composition of essential oils of flowers, leaves, stems and rhizome of *Peucedanum officinale* L. (Apiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, **21**, 123-126.
- Furumoto, T., Yamaguchi, T., Ohshima-Ichie, Y., 2011. A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature*, **476**, 472-475.
- Gkinis, G., Bozin, B., Mimica-Dukić, N., Tzakou, O., 2010. Antioxidant activity of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda* essential oil rich in nepetalactones from Greece. *Journal of Medicinal Food*, **13**, 1176-1181.
- Gniewosz, M., Synowiec, A., 2011. Antibacterial activity of pullulan films containing thymol. *Flavour and Fragrance Journal*, **26**, 389-395.
- Gokturk, R.S., Sagdic, O., Ozkan, G., Unal, O., Aksoy, A., Albayrak, S., Arici, M., Durak, M.Z., 2013. Essential oil compositions and bioactivities of *Thymus revolutus* and *Cyclotrichium origanifolium*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **16**, 795-805.
- Gomes, M.P., Duarte, D.M., Carneiro, M.M.L.C., Barreto, L.C., Carvalho, M., Soares, A.M., Guilherme, L.R.G., Garcia, Q.S., 2013. Zinc tolerance modulation in *Myracrodruon urundeuva* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **67**, 1-6.
- Gormez, A., Bozari, S., Yanmis, D., Gulluce, M., Agar, G., Sahin, F., 2013. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil obtained from *Nepeta nuda* against phytopathogenic bacteria. *Journal of Essential Oil Research*, **25**, 149-153.
- 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**, 322-332.

- Grzebisz, W., 2011. Magnesium-food and human health. *Journal of Elementology*, **16**, 299-323.
- Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P.G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., Berti, L., 2010. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **29**, 873-879.
- Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., Xiang, H., Deng, X., Yu, L., 2009. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, **58**, 1074-1079.
- Gutiérrez-Fernández, J., García-Armesto, M.R., Álvarez-Alonso, R., del Valle, P., de Arriaga, D., Rúa, J., 2013. Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dairy Science*, **96**, 4912-4920.
- Hamoud, R., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M., 2014. Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli*. *Phytomedicine*, **21**, 443-447.
- Harrenga, A., Michel, H., 1999. The cytochrome C oxidase from *Paracoccus denitrificans* does not change the metal center ligation upon reduction. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 33296-33299.
- Hasegawa, P.M., 2013. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany*, **92**, 19-31.
- Hassine, D.B., Ismail, H.B., Jribi, C., Khouja, M.L., Abderrabba, M., 2013. *Eucalyptus oleosa* f. *muell* essential oil: extraction, chemical composition and antimicrobial activity. *Acta Horticulturae*, **997**, 77-82.
- Hawkesford, M., Horsfi, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Skrumsager Møller, I., White, P., 2012. Functions of macronutrients. In: *Mineral nutrition of higher plants, third edition*, Marschner, P., (Ed.). Academic Press, San Diego, pp. 135-189.
- Heipieper, H.J., Keweloh, H., Rehm, H.J., 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 1213-1217.
- Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H., de Bont, J.A.M., 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, **12**, 409-415.

- Hendry, E.R., Worthington, T., Conway, B.R., Lambert, P.A., 2009. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64**, 1219-1225.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, **321**, 117-152.
- Hobbs, M.M., Anderson, J.E., Balthazar, J.T., Kandler, J.L., Carlson, R.W., Ganguly, J., Begum, A.A., Duncan, J.A., Lin, J.T., Sparling, P.F., Jerse, A.E., Shafer, W.M., 2013. Lipid A's structure mediates *Neisseria gonorrhoeae* fitness during experimental infection of mice and men. *American Society for Microbiology (mBio)*, **4**, 1-5.
- Hodson, M.J., 2012. Metal toxicity and tolerance in plants. *Biochemist*, **34**, 28-32.
- Hosaka, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Harada, N., Sano, K., Kimura, M., Yao, M., Wakatsuki, S., 1997. Ribosomal protein S7: a new RNA-binding motif with structural similarities to a DNA architectural factor. *Structure*, **5**, 1199-1208.
- Hus, J.C., Marion, D., Blackledge, M., 2000. *De novo* determination of protein structure by NMR using orientational and long-range restraints. *Journal of Molecular Biology*, **298**, 927-936.
- Husson, O., 2013. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant and Soil*, **362**, 389-417.
- Ilić, B.S., Kocić, B.D., Ćirić, V.M., Cvetković, O.G., Miladinović, D.L., 2014. An *in vitro* synergistic interaction of combinations of *Thymus glabrescens* essential oil and its main constituents with chloramphenicol. *The Scientific World Journal*, **2014**, 1-10.
- Iten, F., Saller, R., Abel, G., Reichling, J., 2009. Additive antimicrobial [corrected] effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris* - chemotype carvacrol. *Planta Medica*, **75**, 1231-1236.
- Jaimand, K., Ashorabadi, E.S., Dini, M., 2006. Chemical constituents of the leaf and seed oils of *Peucedanum officinale* L. cultivated in Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **18**, 670-671.
- Jedlicková, Z., Mottl, O., Serý, V., 1992. Antibacterial properties of the Vietnamese cajeput oil and ocimum oil in combination with antibacterial agents. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, **36**, 303-309.
- Jianu, C., Pop, G., Gruia, A.T., Horhat, F.G., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x*

- intermedia*) grown in western Romania. *International Journal of Agriculture and Biology*, **15**, 772-776.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Stoyanova, A.S., Denkova, Z., Nikolova, R., Geissler, M., 2007. Purity, antimicrobial activities and olfactic evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. *Journal of Essential Oil Research*, **19**, 288-291.
- Kabata-Pendias, A., 2010. *Trace elements in soils and plants, fourth edition*. CRC Press, New York, pp. 548.
- Kabelitz, N., Santos, P.M., Heipieper, H.J., 2003. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiology Letters*, **220**, 223-227.
- Kapetanios, C., Karioti, A., Bojović, S., Marin, P., Veljić, M., Skaltsa, H., 2008. Chemical and principal-component analyses of the essential oils of Apioideae taxa (Apiaceae) from central Balkan. *Chemistry and Biodiversity*, **5**, 101-119.
- Karley, A.J., White, P.J., 2009. Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 291-298.
- Khan, M.S.A., Ahmad, I., 2012. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**, 618-621.
- Kilic, O., Hayta, S., Bagci, E., 2011. Chemical composition of essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. *nuda* (Lamiaceae) from Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, **23**, 2788-2790.
- Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., Preston, J.F., Wei, C.I., 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, **60**, 1364-1368.
- Kirmizibekmez, H., Atay, I., Kaiser, M., Yesilada, E., Tasdemir, D., 2011. *In vitro* antiprotozoal activity of extracts of five Turkish Lamiaceae species. *Natural Product Communications*, **6**, 1697-1700.
- Klein, O., Roth, A., Dornuf, F., Schöller, O., Mäntele, W., 2012. The good vibrations of beer. The use of infrared and UV/VIS spectroscopy and chemometry for the quantitative analysis of beverages. *Zeitschrift für Naturforschung - Section B*, **67**, 1005-1015.
- Kogelmann, W.J., Sharpe, W.E., 2006. Soil acidity and manganese in declining and nondeclining sugar maple stands in Pennsylvania. *Journal of Environmental Quality*, **35**, 433-441.

- Kökdil, G., Kurucu, S., Topçu, G., 1996. Composition of the essential oil of *Nepeta nuda* L. ssp. *albiflora* (Boiss.) gams. *Flavour and Fragrance Journal*, **11**, 167-169.
- Konakchiev, A., Tsankova, E., 2002. The essential oils of *Satureja montana* ssp. *kitaibelii* Wierzb. and *Satureja pilosa* var. *pilosa* Velen from Bulgaria. *Journal of Essential Oil Research*, **14**, 120-121.
- Konieczynski, P., 2013. Principal component analysis in interpretation of the results of HPLC-ELC, HPLC-DAD and essential elemental contents obtained for medicinal plant extracts. *Central European Journal of Chemistry*, **11**, 519-526.
- Kostić, D., Mitić, S., Zarubica, A., Mitić, M., Veličković, J., Randelović, S., 2011. Content of trace metals in medicinal plants and their extracts. *Hemijska Industrija*, **65**, 165-170.
- Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., 2007. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, **62**, 507-513.
- Kundaković, T., Milenković, M., Zlatković, S., Kovačević, N., Goran, N., 2011. Composition of *Satureja kitaibelii* essential oil and its antimicrobial activity. *Natural Product Communications*, **6**, 1353-1356.
- Lakušić, B., Ristić, M., Slavkowska, M., Milenković, V., Lakušić, D., 2011. Environmental and seasonal impacts on the chemical composition of *Satureja horvatii* Šilić (Lamiaceae) essential oils. *Chemistry and Biodiversity*, **8**, 483-493.
- Lengauer, T., Rarey, M., 1996. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*, **6**, 402-406.
- Leslie, A.G.W., 1990. Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **213**, 167-186.
- Lindhauer, M.G., De Fekete, M.A.R., 1990. Starch synthesis in potato (*Solanum tuberosum*) tubers: activity of selected enzymes in dependence of potassium content in storage tissue. *Plant and Soil*, **124**, 291-295.
- Liu, D., Thomson, K., Kaiser, K.L., 1982. Quantitative structure-toxicity relationship of halogenated phenols on bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **29**, 130-136.
- Loska, K., Wiechula, D., 2003. Application of principle component analysis for the estimation of source of heavy metal contamination in surface sediments from the Rybnik reservoir. *Chemosphere*, **51**, 723-733.

- Ložienė, K., Šakalytė, J., Paškevičius, A., Venskutonis, P.R., 2008. Anti-*Candida* activity of *Thymus pulegioides* (Lamiaceae) essential oils depends on the plant chemotype. *Herba Polonica*, **54**, 79-92.
- Macías, F., Camps Arbestain, M., 2010. Soil carbon sequestration in a changing global environment. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, **15**, 511-529.
- Macmaster, R., Zelinskaya, N., Savić, M., Rankin, C.R., Conn, G.L., 2010. Structural insights into the function of aminoglycoside-resistance A1408 16S rRNA methyltransferases from antibiotic-producing and human pathogenic bacteria. *Nucleic Acids Research*, **38**, 7791-7799.
- Maksimović, Z., Stojanović, D., Šoštarić, I., Dajić, Z., Ristić, M., 2008. Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88**, 2036-2041.
- Mancini, E., Arnold, N.A., De Feo, V., Formisano, C., Rigano, D., Piozzi, F., Senatore, F., 2009. Phytotoxic effects of essential oils of *Nepeta curviflora* Boiss. and *Nepeta nuda* L. subsp. *albiflora* growing wild in Lebanon. *Journal of Plant Interactions*, **4**, 253-259.
- Mankin, A.S., Garrett, R.A., 1991. *Journal of Bacteriology*, **173**, 3559-3563.
- Maree, J., Kamatou, G., Gibbons, S., Viljoen, A., Van Vuuren, S., 2014. The application of GC-MS combined with chemometrics for the identification of antimicrobial compounds from selected commercial essential oils. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **130**, 172-181.
- Mariani, R., Maffioli, S.I., 2009. Bacterial RNA polymerase inhibitors: an organized overview of their structure, derivatives, biological activity and current clinical development status. *Current Medicinal Chemistry*, **16**, 430-454.
- Márquez-García, B., Córdoba, F., 2010. Antioxidative system in wild populations of *Erica andevalensis*. *Environmental and Experimental Botany*, **68**, 58-65.
- Marschner, P., 2012. *Mineral nutrition of higher plants, third edition*. Academic Press, San Diego, pp. 672.
- Masoudi, S., Esamaeili, A., Khalilzadeh, M.A., Rustaiyan, A., Moazami, N., Akhgar, M.R., Varavipoor, M., 2006. Volatile constituents of *Dorema aucheri* Boiss., *Seseli libanotis* (L.) W.D. Koch var. *armeniacum* Bordz. and *Conium maculatum* L. three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, **21**, 801-804.
- Matan, N., Nisoa, M., Matan, N., 2014. Antibacterial activity of essential oils and their main components enhanced by atmospheric RF plasma. *Food Control*, **39**, 97-99.

- Matejić, J.S., Džamić, A.M., Ćirić, A.D., Krivošej, Z., Randelović, V.N., Marin, P.D., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts of four *Peucedanum* L. species. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **8**, 655-665.
- Matthias, O., 2007. *Chemometrics*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 343.
- McMurry, L.M., George, A.M., Levy, S.B., 1994. Active efflux of cloramphenicol in susceptible *Escherichia coli* strains and in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38**, 542-546.
- Meda, A.R., Scheuermann, E.B., Prechsl, U.E., 2007. Iron acquisition by phytosiderophores contributes to cadmium tolerance. *Plant Physiology*, **143**, 1761-1773.
- Meena, A.K., Bansal, P., Kumar, S., Rao, M.M., Garg, V.K., 2010. Estimation of heavy metals in commonly used medicinal plants: a market basket survey. *Environmental Monitoring and Assessment*, **170**, 657-660.
- Michet, A., Chalchat, J.C., Figuérédo, G., Thébaud, G., Billy, F., Pétel, G., 2008. Chemotypes in the volatiles of wild thyme (*Thymus pulegioides* L.). *Journal of Essential Oil Research*, **20**, 101-103.
- Mihajilov-Krstev, T., Kitić, D., Radnović, D., Ristić, M., Mihajlović-Ukropina, M., Zlatković, B., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* essential oil against pathogenic microbial strains. *Natural Product Communications*, **6**, 1167-1172.
- Miladinović, D., 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Serbia. *Pharmacia*, **52**, 46-49.
- Miladinović, D., 2011b. *Antioksidantni sistem biljaka*. Tehnološki fakultet Univerziteta u Nišu, Niš, pp. 127.
- Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Mihajilov-Krstev, T.M., Jović, J.L., Marković, M.S., 2014. *In vitro* antibacterial activity of *Libanotis montana* essential oil in combination with conventional antibiotics. *Natural Product Communications*, **9**, 281-286.
- Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Mihajilov-Krstev, T.M., Nikolić, N.D., Miladinović, L.C., Cvetković, O.G., 2012. Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **403**, 1007-1018.
- Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Miladinović, L.C., Kocić, B.D., Ćirić, V.M., Stankov-Jovanović, V.P., Cvetković, O.G., 2013. Antibacterial activity of *Thymus pulegioides* essential oil and its synergistic potential with antibiotics: a chemometric approach. In: *Recent Progress in Medicinal Plants vol. 38: Essential Oils III and Phytopharmacology*, Govil, J.N., Bhattacharya, S., (Eds.). Studium Press LLC, Houston, pp. 101-136.

- Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Milosavljević, V.N., 2011a. Trace elements and antioxidants in *Astragalus onobrychis* L. subsp. *chlorocarpus* (Griseb.) S. Kozuharov et D.K. Pavlova. *Hemijska Industrija*, **65**, 323-327.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A.G., Mora, M.L., Alberdi, M., 2010. Manganese as essential and toxic element for plants: Transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **10**, 476-494.
- Mnif, W., Dhifi, W., Jelali, N., Baaziz, H., Hadded, A., Hamdi, N., 2011. Characterization of leaves essential oil of *Pelargonium graveolens* originating from Tunisia: Chemical composition, antioxidant and biological activities. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **14**, 761-769.
- Mohamed, A.M.O., Antia, H.E., 1998. *Geoenvironmental engineering*. Elsevier, Amsterdam, pp. 706.
- Moreira, M.A.S., Oliveira, J.A., Teixeira, L.M., Moraes, C.A., 2005. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. *Veterinary Microbiology*, **109**, 75-81.
- Morić, I., Savić, M., Ilić-Tomić, T., Vojnović, S., Bajkić, S., Vasiljević, B., 2010. rRNA methyltransferases and their role in resistance to antibiotics. *Journal of Medical Biochemistry*, **29**, 165-174.
- Mueller, D., Ferrão, M.F., Marder, L., Da Costa, A.B., Schneider, R.C., 2013. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and multivariate analysis for identification of different vegetable oils used in biodiesel production. *Sensors*, **13**, 4258-4271.
- Neter, E., Gorzynski, E.A., Westphal, O., Lüderitz, O., 1958. The effects of antibiotics on enterobacterial lipopolysaccharides (endotoxins), hemagglutination and hemolysis. *The Journal of Immunology*, **80**, 66-72.
- Neumann, G., Kabelitz, N., Zehnsdorf, A., Miltner, A., Lippold, H., Meyer, D., Schmid, A., Heipieper, H.J., 2005. Prediction of the adaptability of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a second phase of a solvent for economically sound two-phase biotransformations. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6606-6612.
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martinez, V., Rubio, F., 2014. K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. *Journal of Plant Physiology*, **171**, 688-695.
- Olajuyigbe, O.O., Afolayan, A.J., 2012. Synergistic interactions of methanolic extract of *Acacia mearnsii* De Wild. with antibiotics against bacteria of clinical relevance. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 8915-8932.

- Olowoyo, J.O., Okedeyi, O.O., Mkolo, N.M., Lion, G.N., Mdakane, S.T.R., 2012. Uptake and translocation of heavy metals by medicinal plants growing around a waste dump site in Pretoria, South Africa. *South African Journal of Botany*, **78**, 116-121.
- Omezzine, F., Daami-Remadi, M., Rinez, A., Ladhari, A., Haouala, R., 2011. *In vitro* assessment of *Inula* spp. organic extracts for their antifungal activity against some pathogenic and antagonistic fungi. *African Journal of Microbiology Research*, **5**, 3527-3531.
- Ozores-Hampton, M., 2013. Effective strategies to correct iron deficiency in Florida vegetable crops. *HortTechnology*, **23**, 548-552.
- Ozturk, S., Ercisli, S., 2006. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Seseli libanotis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 261-265.
- Padeletti, G., Fermo, P., 2010. A scientific approach to the attribution problem of renaissance ceramic productions based on chemical and mineralogical markers. *Applied Physics A*, **100**, 771-784.
- Palaniappan, K., Holley, R.A., 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **140**, 164-168.
- Palić, M.R., Gašić, J.M., 1993. Hemijski sastav etarskog ulja biljaka roda *Satureja* L. *Farmaceutsko-hemijska industrija "Zdravlje"*, **3**, 14-19.
- Pavel, M., Ristić, M., Stević, T., 2010. Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Serbian Chemical Society*, **75**, 27-34.
- Pemmaraju, S.C., Pruthi, P.A., Prasad, R., Pruthi, V., 2013. *Candida albicans* biofilm inhibition by synergistic action of terpenes and fluconazole. *Indian Journal of Experimental Biology*, **51**, 1032-1037.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira, J., 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, **55**, 1367-1373.
- Pluhár, Z., Kocsis, M., Kuczmog, A., Csete, S., Simkó, H., Sárosi, S., Molnár, P., Horváth, G., 2012. Essential oil composition and preliminary molecular study of four Hungarian *Thymus* species. *Acta Biologica Hungarica*, **63**, 81-96.

- Pluhár, Z., Sárosi, S., Novák, I., Kutta, G., 2008. Essential oil polymorphism of Hungarian common thyme (*Thymus glabrescens* Willd.) populations. *Natural Product Communications*, **3**, 1151-1154.
- Pluhár, Z., Sárosi, S., Simkó, H., 2012. Environmental conditions and essential oil diversity of native *Thymus pulegioides* populations in highlands of Hungary and in the Carpathians. *Acta Horticulturae*, **955**, 65-71.
- Radonić, A., Mastelić, J., 2008. Essential oil and glycosidically bound volatiles of *Thymus pulegioides* L. growing wild in Croatia. *Croatica Chemica Acta*, **81**, 599-606.
- Rădulescu, V., Pavel, M., Teodor, A., Tănase, A., Ilieș, D.C., 2009. Analysis of volatile compounds from infusion and hydrodistillate obtained from the species *Thymus pulegioides* L. (Lamiaceae). *Farmacologia*, **57**, 282-289.
- Radulović, N., Blagojević, P.D., Rabbitt, K., De Sousa Menezes, F., 2011. Essential oil of *Nepeta x faassenii* Bergmans ex Stearn (*N. mussinii* Spreng. x *N. nepetella* L.): a comparison study. *Natural Product Communications*, **6**, 1015-1022.
- Rastogi, V.K., Girvin, M.E., 1999. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature*, **402**, 263-268.
- Reddy, A.S., Pati, S.P., Kumar, P.P., Pradeep, H.N., Sastry, G.N., 2007. Virtual screening in drug discovery - a computational perspective. *Current Protein and Peptide Science*, **8**, 329-351.
- Reid, M.K., Spencer, K.L., Shotbolt, L., 2011. An appraisal of microwave-assisted Tessier and BCR sequential extraction methods for the analysis of metals in sediments and soils. *Journal of Soils and Sediments*, **11**, 518-528.
- Ren, W., Xue, B., Geng, Y., Sun, L., Ma, Z., Zhang, Y., Mitchell, B., Zhang, L., 2014. Inventorying heavy metal pollution in redeveloped brownfield and its policy contribution: case study from Tiexi District, Shenyang, China. *Land Use Policy*, **38**, 138-146.
- Rokbeni, N., M'rabet, Y., Dziri, S., Chaabane, H., Jemli, M., Fernandez, X., Boulila, A., 2013. Variation of the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of natural populations of Tunisian *Daucus carota* L. (Apiaceae). *Chemistry and Biodiversity*, **10**, 2278-2290.
- Roman, I., Rusu, M.A., Puică, C., Deliu, C., 2011. Some histoenzymological (histochemical) and biochemical changes induced by *Peucedanum* herbal extracts upon the liver and kidney in rats. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, **16**, 69-73.
- Ruan, J., Ma, L., Yang, Y., 2012. Magnesium nutrition on accumulation and transport of amino acids in tea plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **92**, 1375-1383.

- Sabiene, N., Kusliene, G., Zaleckas, E., 2010. The influence of land use on soil organic carbon and nitrogen content and redox potential. *Zemdirbyste*, **97**, 15-24.
- Saito, H., Koyasu, J., Shigeoka, T., Tomita, I., 1994. Cytotoxicity of chlorophenols to goldfish GFS cells with the MTT and LDH assays. *Toxicology in Vitro*, **8**, 1107-1112.
- Salter, A., Wiseman, H., Tucker, G., 2012. *Phytonutrients*. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, pp. 312.
- Sarath Chandra Bose, N., Ammani, K., Ratakumari, S., 2013. Chemical composition and its antibacterial activity of essential oil from *Cymbopoton jwarancusa*. *International Journal of Bio-Pharma Research*, **2**, 97-100.
- Sarer, E., Konuklugil, B., 1996. Composition of the essential oil from *Nepeta nuda* ssp. *albiflora* (Boiss.) gams. *Journal of Essential Oil Research*, **8**, 687-688.
- Sárosi, S., Bernáth, J., Bertoli, A., Pistelli, L., Benvenuti, S., 2008. Essential oil polymorphism of *Thymus pulegioides* collected in Monti Pisani, Italy. *Acta Horticulturae*, **955**, 59-64.
- Schmidt, E., Wanner, J., Höferl, M., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Gochev, V., Girova, T., Stoyanova, A., Geissler, M., 2012. Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in Southern France. *Natural Product Communications*, **7**, 1095-1098.
- Shin, S., 2003. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. *Archives of Pharmacal Research*, **26**, 389-393.
- Shin, S., Lim, S., 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 1289-1296.
- Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 8022-8028.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, **59**, 201-222.
- Sikkema, J., Poolman, B., Konings, W.N., de Bont, J.A., 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *Journal of Bacteriology*, **174**, 2986-2992.
- Simkó, H., Sárosi, S., Ladányi, M., Marton, B., Radácsi, P., Csontos, P., Gosztola, B., Kun, R., Pluhár, Z., 2013. Studies on occurrence, essential oil data and habitat conditions of

- Hungarian *Thymus pannonicus* and *Thymus glabrescens* populations. *Medicinal and Aromatic Plants*, **2**, 1-7.
- Singh, D., Kumar, T.R.S., Gupta, V.K., Chaturvedi, P., 2012. Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulations. *Indian Journal of Experimental Biology*, **50**, 714-717.
- Skalicka-Wozniak, K., Los, R., Glowniak, K., Malm, A., 2010. Comparison of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction techniques for antibacterial volatile compounds from the fruits of *Seseli libanotis*. *Natural Product Communications*, **5**, 1427-1430.
- Skyllberg, U., Raulund-Rasmussen, K., Borggaard, O.K., 2001. pH buffering in acidic soils developed under *Picea abies* and *Quercus robur*-effects of soil organic matter, adsorbed cations and soil solution ionic strength. *Biogeochemistry*, **56**, 51-74.
- Slavkowska, V., Jančić, R., Bojović, S., Milosavljević, S., Đoković, 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**, 71-76.
- Soares Leal, A., Prado, G., Bomfim Gomes, T.C., Peixoto Sepe, F., Dalmázio, I., 2013. Determination of metals in medicinal plants highly consumed in Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49**, 599-607.
- Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 136-141.
- Sonboli, A., Gholipour, A., Yousefzadi, M., 2012. Antibacterial activity of the essential oil and main components of two *Dracocephalum* species from Iran. *Natural Product Research*, **26**, 2121-2125.
- Sook, L., Shin, S., 2007. Synergism in antifungal activity against *Candida* and *Trichophyton* species in combination with the essential oil of *Coriandrum sativum* L. and antibiotics. *Natural Product Sciences*, **13**, 85-89.
- Sparks, D. L., 2003. *Environmental soil chemistry, second edition*. Academic Press, San Diego, pp. 352.
- Stanković, N.S., Čomić, L.R., Kocić, B.D., Nikolić, D.M., Mihajilov-Krstev, T.M., Ilić, B.S., Miladinović, D.L., 2011. Antibacterial activity chemical composition relationship of the essential oils from cultivated plants from Serbia. *Hemijaska Industrija*, **65**, 583-589.
- Stanković, T., Kolundžija, B., Ćirić, A., Soković, M., Nikolić, D., Kundaković, T., 2013. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff (Lamiaceae). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **8**, 845-854.

- Stefanakis, M.K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H.E., Makridis, P., 2013. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*, **34**, 539-546.
- Stefanović, O.D., Stanojević, D.D., Čomić, L.R., 2012. Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **69**, 457-463.
- Steitz, T.A., 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**, 242-253.
- Subbarao, G.V., Ito, O., Berry, W.L., Wheeler, R.M., 2003. Sodium: a functional plant nutrient. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **22**, 391-416.
- Subramanian, R., Gayathri, S., Rathnavel, C., Raj, V., 2012. Analysis of mineral and heavy metals in some medicinal plants collected from local market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2012**, 74-78.
- Suits, M.D.L., Sperandeo, P., Dehò, G., Polissi, A., Jia, Z., 2008. Novel structure of the conserved gram-negative lipopolysaccharide transport protein A and mutagenesis analysis. *Journal of Molecular Biology*, **380**, 476-488.
- Sung, M.T., Lai, Y.T., Huang, C.Y., Chou, L.Y., Shih, H.W., Cheng, W.C., Wong, C.H., Ma, C., 2009. Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1B from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 8824-8829.
- Sutherland, R.A., 2010. BCR-701: a review of 10-years of sequential extraction analyses. *Analytica Chimica Acta*, **680**, 10-20.
- Tan, K.H., 1998. *Principles of soil chemistry, third edition*. CRC Press, New York, pp. 560.
- Tang, W.W., Zeng, G.M., Gong, J.L., Liang, J., Xu, P., Zhang, C., Huang, B.B., 2014. Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: a review. *Science of the Total Environment*, **468**, 1014-1027.
- Tekoriene, R., Ložiene, K., 2012. Disinfecting capacity of essential oil of *Thymus pulegioides* L. (Lamiaceae) chemotypes against phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Acta Alimentaria*, **41**, 257-264.
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, **119**, 62-70.
- Tepe, B., Akpulat, H.A., Sokmen, M., 2011. Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oils of *Peucedanum longifolium* (Waldst. & Kit.) and *P. palimbioides* (Boiss.). *Records of Natural Products*, **5**, 108-116.

- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., 2013. Oxidative stress and antioxidant responses of mulberry (*Morus alba*) plants subjected to deficiency and excess of manganese. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**, 3345-3356.
- Topçu, G., Öksüz, S., Shieh, H.L., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Bozok-Johansson, C., 1993. Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Inula graveolens*. *Phytochemistry*, **33**, 407-410.
- Toroglu, S., 2011. Antimicrobial activity of essential oil of *Thymus kotschyanus* subsp. *glabrescens*. *Asian Journal of Chemistry*, **23**, 1072-1074.
- Tourigny, D.S., Fernandez, I.S., Kelley, A.C., Ramakrishnan, V., 2013. Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation. *Science*, **340**, 1235490-1235490.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 2474-2478.
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, **31**, 455-461.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., Krisch, J., 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, **144**, 480-486.
- Turgis, M., Han, J., Caillet, S., Lacroix, M., 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, **20**, 1073-1079.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4606-4610.
- Uribe, S., Rangel, P., Espinola, G., Aguirre, G., 1990. Effects of cyclohexane, an industrial solvent, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and on isolated yeast mitochondria. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 2114-2119.
- Van Der Plas, L.H.W., Jobse, P.A., Verleur, J.D., 1976. Cytochrome C dependent, antimycin-A resistant respiration in mitochondria from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). Influence of wounding and storage time on outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **430**, 1-12.
- 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**, 440-446.

- Van Vuuren, S.F., Viljoen, A. M., 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, **22**, 540-544.
- Végh, A., Bencsik, T., Molnár, P., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., Kovács, K., Kocsis, B., Horváth, G., 2012. Composition and antipseudomonal effect of essential oils isolated from different lavender species. *Natural Product Communications*, **7**, 1393-1396.
- Veras, H.N.H., Campos, A.R., Rodrigues, F.F.G., Botelho, M.A., Coutinho, H.D.M., da Costa, J.G.M., 2011. *Lippia alba* (Mill.) N.E. essential oil interfere with aminoglycosides effect against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **14**, 574-581.
- Watanabe, T., Broadley, M.R., Jansen, S., White, P.J., Takada, J., Satake, K., Takamatsu, T., Tuah, S.J., Osaki, M., 2007. Evolutionary control of leaf element composition in plants. *New Phytologist*, **174**, 516-523.
- Wigoda, N., Moshelion, M., Moran, N., 2014. Is the leaf bundle sheath a “smart flux valve” for K⁺ nutrition? *Journal of Plant Physiology*, **171**, 715-722.
- Williams, L., Salt, D.E., 2009. The plant ionome coming into focus. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 247-249.
- Wold, S., Sjöström, M., 1998. Chemometrics, present and future success. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **44**, 3-14.
- Worwood, V.A., 1993. *The complete book of essential oils and aromatherapy*. New World Library, Novato, pp. 421.
- Wyles, D.L., Kaihara, K.A., Vaida, F., Schooley, R.T., 2007. Synergy of small molecular inhibitors of hepatitis C virus replication directed at multiple viral targets. *Journal of Virology*, **81**, 3005-3008.
- Yang, J., Tam, N.F.Y., Ye, Z., 2014. Root porosity, radial oxygen loss and iron plaque on roots of wetland plants in relation to zinc tolerance and accumulation. *Plant and Soil*, **374**, 815-828.
- Yang, T., Poovaiah, B.W., 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 4097-4102.
- Yemane, M., Chandravanshi, B.S., Wondimu, T., 2008. Levels of essential and non-essential metals in leaves of the tea plant (*Camellia sinensis* L.) and soil of Wushwush farms, Ethiopia. *Food Chemistry*, **107**, 1236-1243.

- Yildirim, A.B., Karakas, F.P., Turker, A.U., 2013. *In vitro* antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **6**, 616-624.
- Zarrini, G., Delgosha, Z.B., Moghaddam, K.M., Shahverdi, A.R., 2010. Post-antibacterial effect of thymol. *Pharmaceutical Biology*, **48**, 633-636.
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., Liang, H., 2014. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry*, **150**, 307-312.
- Zhu, J., Shan, J., Qiu, P., Qin, Y., Wang, C., He, D., Sun, B., Tong, P., Wu, S., 2004. The multivariate statistical analysis and XRD analysis of pottery at Xigongqiao site. *Journal of Archaeological Science*, **31**, 1685-1691.
- Zimmerman, A.J., Weindorf, J.D., 2010. Heavy metal and trace metal analysis in soil by sequential extraction: a review of procedures. *International Journal of Analytical Chemistry*, **2010**, 1-7.
- Zvezdanović, J., Marković, D., Nikolić, G., 2007. Different possibilities for the formation of complexes of copper and zinc with chlorophyll inside photosynthetic organelles: chloroplasts and thylakoids. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **72**, 1053-1062.

7. PRILOG

Research Article

An *In Vitro* Synergistic Interaction of Combinations of *Thymus glabrescens* Essential Oil and Its Main Constituents with Chloramphenicol

Budimir S. Ilić,¹ Branislava D. Kocić,² Vojislav M. Ćirić,³
Olga G. Cvetković,⁴ and Dragoljub L. Miladinović¹

¹ Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Niš, 18000 Niš, Serbia

² Center for Microbiology, Institute for Public Health, 18000 Niš, Serbia

³ Clinic for Endocrinology, Diabetes and Diseases of Metabolism, Clinical Center Niš, 18000 Niš, Serbia

⁴ Center of Chemistry, ICTM, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

Correspondence should be addressed to Budimir S. Ilić; bucabule@yahoo.com

Received 23 August 2013; Accepted 20 November 2013; Published 28 January 2014

Academic Editors: L. Kong and D. Ruzek

Copyright © 2014 Budimir S. Ilić et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The chemical composition and antibacterial activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil were examined, as well as the association between it and chloramphenicol. The antibacterial activities of geraniol and thymol, the main constituents of *T. glabrescens* oil, individually and in combination with chloramphenicol, were also determined. The interactions of the essential oil, geraniol, and thymol with chloramphenicol toward five selected strains were evaluated using the microdilution checkerboard assay in combination with chemometric methods. Oxygenated monoterpenes were the most abundant compound class in the oil, with geraniol (22.33%) as the major compound. The essential oil exhibited *in vitro* antibacterial activity against all tested bacterial strains, but the activities were lower than those of the standard antibiotic and thymol. A combination of *T. glabrescens* oil and chloramphenicol produced a strong synergistic interaction (FIC indices in the range 0.21–0.87) and a substantial reduction of the MIC value of chloramphenicol, thus minimizing its adverse side effects. The combinations geraniol-chloramphenicol and thymol-chloramphenicol produced synergistic interaction to a greater extent, compared with essential oil-chloramphenicol association, which may indicate that the activity of the thyme oil could be attributed to the presence of significant concentrations of geraniol and thymol.

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) represents a rapidly growing public health concern worldwide. AMR has been observed following the introduction of every antimicrobial agent into clinical practice. For example, resistance of the bacterium *Staphylococcus aureus* to penicillin was encountered in hospitals in the mid-1940s, only a few years after the introduction of penicillin [1]. A multifaceted approach is needed to combat AMR, including the discovery of novel antimicrobial drugs and/or new methodological concepts.

Many studies have shown significant antibacterial activity of essential oils against a wide range of resistant microbial strains [2]. The antibacterial activity of essential oils could

reflect all the molecules present or only those present in high amounts. For the same reasons, no particular bacterial resistance or adaptation to essential oils has been described and secondary effects have not been confirmed. To enhance the efficacy of antimicrobial drugs and avoid their potentially toxic side effects, their combination with an essential oil may be an innovative alternative and promising strategy [3].

The genus *Thymus* contains about 350 species, most commonly used in traditional medicine as antibacterial and antifungal remedies [4]. The Serbian flora recognizes 30 species of the *Thymus* genus, with more than 60 varieties [5].

Given the importance of *Thymus* species as useful antibacterial remedies, the aim of the present study was to examine the chemical composition and antibacterial effect

of the essential oil of *Thymus glabrescens* (thyme), as well as the association between it and chloramphenicol. The antibacterial activities of geraniol and thymol, the main active principles of thyme oil, in combination with chloramphenicol were also determined.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Chemicals. The aerial parts of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) were collected in June 2011 from natural populations at the Kravlje village, southeast Serbia. A voucher specimen, with the accession number 16642, is deposited at the Herbarium of the Department of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade Herbarium Code BEOU. All chemicals, reagents, and standards were of analytical reagent grade and were purchased from the Sigma-Aldrich Chemical Company.

2.2. Oil Isolation. The aerial parts of the plant (dried and ground) were subjected to hydrodistillation for 4 h, using a Clevenger-type apparatus to obtain the oil. The resulting essential oil was dried over anhydrous sodium sulphate and stored at 4°C.

2.3. Chemical Analysis. Quantitative and qualitative data of the essential oil were obtained by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) analyses.

2.4. Gas Chromatography. The GC analysis of the oil was performed on a GC HP-5890 II apparatus, equipped with the split-splitless injector, an HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness) using helium as the carrier gas (1 mL/min), and an FID. Operating conditions were as follows: injector temperature 250°C, interface temperature of 280°C, temperature program from 50°C (3 min) to 250°C at a rate of 3°C/min.

2.5. Gas Chromatography/Mass Spectrometry. GC-MS analyses were performed on an Agilent Technologies apparatus, Model GS 6890N at 70 eV coupled with a mass selective detector MSD 5975C, under the same gas-chromatographic conditions.

2.6. Identification of Compounds. Identification of the compounds was based on comparison of arithmetic retention indices (applying calibrated automated mass spectral deconvolution and identification system software AMDIS ver. 2.64) in combination with the selective ion analysis (SIA) resolution method by Tan et al. [6], comparison with the spectral data from the available literature [7], and comparison of their mass spectra to those from Wiley 275 and NIST/NBS libraries using various search engines. The retention indices were obtained by coinjection with a standard aliphatic hydrocarbons C₇-C₄₀ mixture.

2.7. Antibacterial Testing. The activity of the essential oil samples was tested towards 13 different bacteria. Gram-negative

bacteria were represented by *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, while the researched Gram-positive strains were *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

The inocula of the bacterial strains were prepared from overnight broth cultures and the suspensions were adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity (corresponding to 10⁸ CFU/mL, depending on genera-consensus standard by the Clinical and Laboratory Standards Institute) [8].

2.8. Microwell Dilution Assay. A broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [8]. Serial double dilutions of the tested oil, as well as the geraniol and thymol, were prepared in 70.0% ethanol and then transferred into a 96-well microtiter plate over the concentration range of 0.025–50.0 µL/mL in inoculated nutrient broth. The final volume was 100 µL and the final bacterial concentration was 10⁷ CFU/mL in each well. The plate was incubated for 24 h at 37°C. All experiments were performed in triplicate. Two controls were included, a medium with solvent/ethanol (negative control) and a medium with antibiotic chloramphenicol (positive control). Bacterial growth was determined by adding 20 µL of an aqueous 0.5% triphenyl tetrazolium chloride (TTC) solution. The minimal inhibitory concentration was defined as the lowest concentration of the oil inhibiting visible growth (red collared pellet on the bottom of the wells after the addition of TTC), while the minimal bactericidal concentration was defined as the lowest oil concentration killing 99.9% of the bacterial cells. To determine the MBC, the broth was taken from each well without visible growth and inoculated in Mueller Hinton agar (MHA) for 24 h at 37°C.

2.9. Microdilution Checkerboard Assay. The microdilution checkerboard method is the technique used most frequently to assess antimicrobial combinations *in vitro* [9, 10]. Dilutions of *T. glabrescens* oil, geraniol, thymol, and the examined antibiotic were made for evaluation of their combined interactions. The type of interaction was studied on the *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *S. aureus* ATCC 29213. These strains were selected based on their importance in frequently occurring infections. Dilutions from the logarithmic-growth phase of the bacterial culture were prepared and distributed into microtiter trays containing combinations of varying concentrations: chloramphenicol-*T. glabrescens* oil, chloramphenicol-geraniol, and chloramphenicol-thymol. The CLSI [8] guidelines were used to ensure that accurate microbiological assay and transfer techniques were followed. The inoculated trays were incubated at 37°C for 24 h and then

evaluated for bacterial growth. Determinations of essential oil-antibiotic interactions were based on the median-effect principle and multiple drug effect equation as described by Chou and Talalay [11]. Three effects can be highlighted: synergistic, additive, or antagonist as a result of the combined effects of the *T. glabrescens* oil, geraniol, thymol, and chloramphenicol. For quantitative purposes the concept of fractional inhibitory concentrations (FIC) is frequently used. In order to assess the activities of combinations of two drugs that are mutually nonexclusive (have different modes of action), the FIC indices were calculated as

$$\begin{aligned} \text{FIC} &= \frac{\text{MIC}_A \text{ combination}}{\text{MIC}_A \text{ alone}} + \frac{\text{MIC}_B \text{ combination}}{\text{MIC}_B \text{ alone}} \\ &+ \frac{\text{MIC}_A \text{ combination} \times \text{MIC}_B \text{ combination}}{\text{MIC}_A \text{ alone} \times \text{MIC}_B \text{ alone}} \\ \text{FIC} &= \text{FIC}_A + \text{FIC}_B + \text{FIC}_A \times \text{FIC}_B, \end{aligned} \quad (1)$$

where MIC_A are the minimum concentrations of the essential oil, geraniol, and thymol, while MIC_B are the minimum concentrations of the examined antibiotic that inhibited the bacterial growth, respectively. The FIC indices were calculated using CalcuSyn (Biosoft), and the results were interpreted as follows: synergistic (<0.90), additive ($0.90 \leq \text{FIC} \leq 1.10$), or antagonistic (>1.10) [12].

2.10. Statistical Analysis of Data. The experimental data (FIC values) were analyzed by chemometric methods: principal components analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA), using Mathworks MATLAB.

3. Results

To eliminate any kind of subjective analysis, interpretations and discussions of the results, presented by tables and/or graphics, and the chemometric methods: principal component analysis, and hierarchical cluster analysis were employed. Furthermore, the use of chemometric methods allows the maximum number of experimental results to be obtained and moreover enables the detection of connections, similarities, and differences among variables in the researched experimental system [4].

3.1. Chemical Composition of the Essential Oil. The yield of *T. glabrescens* essential oil was 0.59% (w/w). Based on GC and GC-MS analysis of the thyme essential oil, 56 components were identified that represented 97.76% of the total detected constituents (Table 1). The components of *T. glabrescens* essential oil were separated into six classes, that is, monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes, phenolic compounds, and others. The oxygenated monoterpenes were the most abundant compound class in the oil (57.14%), and they were dominated by geraniol (22.33%), geranyl acetate (19.38%), and linalool (5.49%).

The group of phenolic compounds (14%) was mainly dominated by thymol (13.79%).

3.2. Antibacterial Activity. The essential oils were tested for their antibacterial activity by broth microdilution method to determine the MIC and MBC values against thirteen model bacteria (Table 2). The results from the antibacterial assay show that thyme essential oil possessed antimicrobial activities against all the tested microorganisms with MIC values ranging from 627.1 to 10033.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBC values from 627.1 to 20067.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Gram-positive bacteria were generally found to be more sensitive than the Gram-negative ones. Geraniol was active with MIC values ranging from 1386.8 to 5547.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBC values from 1386.8 to 11094.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Thymol exhibited antibacterial activity with MIC values ranging from 24.4 to 3123.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBC values from 24.4 to 6246.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The reference antibiotic was active in the range of concentration 1 to 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.3. Interactions between the Essential Oil, Geraniol, and Thymol with the Reference Antibiotic. The results of the possible interactions between the essential oil, geraniol, and thymol with the reference antibiotic are given in Figures 1–3.

Of the 45 combinations of *T. glabrescens* essential oil-chloramphenicol, 25 (55.6%) showed synergism, while 14 (31.1%) had an additive and 6 (13.3%) had an antagonistic effect (Figure 1). Studies on *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 showed a synergistic pattern for seven ratios (FIC indices in the range 0.21–0.87). Synergy was also noted when tested against *P. aeruginosa* ATCC 27853 (six ratios, FIC indices in the range 0.43–0.87) and *P. mirabilis* ATCC 12453 (five ratios, FIC indices in the range 0.68–0.82). Combinations with *S. aureus* ATCC 29213 indicated additive (five ratios) and antagonistic (four ratios) effects.

From all the tested combinations of geraniol-reference antibiotic (Figure 2), 26 (57.8%) showed synergism, 15 (33.3%) had an additive effect, and 4 (8.9%) had an antagonistic effect. Studies on *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 showed a synergistic pattern for seven ratios (FIC indices in the range 0.21–0.87). Synergy was also noted when tested against *P. mirabilis* ATCC 12453 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 (six ratios, FIC indices in the range 0.43–0.87). Combinations with *S. aureus* ATCC 29213 indicated additive (five ratios) and antagonistic (four ratios) effects.

The combination profiles of thymol with chloramphenicol are presented in Figure 3. A predominantly synergistic profile was noted against all the studied pathogens. Synergy was best noted for 32 (71.1%) ratios, an additive effect was recorded for 10 (22.2%), ratios and three combinations (6.7%), against *S. aureus* ATCC 29213, exhibited an antagonistic effect. To evaluate the correlation among the antibacterial activities of the essential oil-chloramphenicol, geraniol-chloramphenicol, and thymol-chloramphenicol combinations, the FIC values were subjected to PCA and HCA analysis.

TABLE 1: Composition of the essential oil of *T. glabrescens*.

Component	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>T. glabrescens</i> (%)
Monoterpene hydrocarbons				11.07
α-Thujene	8.161	924.0	925.0	0.33
α-Pinene	8.400	932.0	932.1	0.29
Camphene	8.951	946.0	948.4	0.15
Sabinene	9.734	969.0	971.6	0.09
β-Pinene	9.897	974.0	976.5	0.10
Myrcene	10.320	988.0	989.0	0.59
α-Phellandrene	10.909	1002.0	1006.1	0.10
3-Carene	10.984	1008.0	1007.9	0.03
α-Terpinene	11.294	1014.0	1016.6	0.60
o-Cymene	11.620	1022.0	1025.6	4.73
Limonene	11.751	1024.0	1029.2	0.81
β-cis-Ocimene	11.980	1032.0	1035.6	0.15
β-trans-Ocimene	12.362	1044.0	1046.1	0.18
γ-Terpinene	12.822	1054.0	1058.7	2.75
Terpinolene	13.767	1086.0	1084.8	0.17
Oxygenated monoterpenes				57.14
Eucalyptol	11.861	1026.0	1032.3	0.56
trans-Linalool oxide	13.828	1084.0	1086.5	0.03
Linalool	14.437	1095.0	1103.2	5.49
α-Thujone	14.603	1101.0	1107.8	0.38
cis-p-Mentha-2,8-dienol	15.697	1133.0	1138.4	0.01
Borneol	16.956	1165.0	1173.0	0.47
4-Terpineol	17.249	1174.0	1181.1	0.47
α-Terpineol	17.790	1186.0	1196.1	0.79
trans-Dihydrocarvone	18.088	1200.0	1204.5	0.02
Nerol	18.842	1227.0	1226.3	1.18
Isobornyl formate	18.990	1235.0	1230.5	2.87
Neral	19.311	1235.0	1239.8	2.25
Geraniol	19.936	1249.0	1257.8	22.33
Geranial	20.396	1264.0	1271.0	0.50
Bornyl acetate	20.924	1287.0	1286.3	0.20
Nerol acetate	23.364	1359.0	1359.2	0.21
Geranyl acetate	24.244	1379.0	1385.8	19.38
Sesquiterpene hydrocarbons				14.56
α-Cubebene	23.065	1345.0	1350.2	5.51
α-Copaene	23.927	1374.0	1376.2	0.03
β-Elemene	24.409	1389.0	1390.7	0.09
β-Caryophyllene	25.384	1417.0	1421.3	1.04
α-trans-Bergamotene	25.770	1432.0	1433.6	0.05
Aromadendrene	25.952	1439.0	1439.4	0.12
(Z)-β-Farnesene	26.376	1440.0	1452.9	0.22
α-Humulene	26.487	1452.0	1456.4	0.13
γ-Muurolene	27.083	1478.0	1475.4	0.16
Germacrene D	27.302	1484.0	1482.4	1.57
β-Selinene	27.567	1489.0	1490.8	0.14
Bicyclogermacrene	27.734	1500.0	1496.2	1.01
β-Bisabolene	28.153	1505.0	1510.0	4.08
γ-Cadinene	28.258	1513.0	1513.6	0.11
δ-Cadinene	28.410	1522.0	1518.7	0.21
β-Sesquiphellandrene	28.563	1521.0	1523.9	0.09

TABLE 1: Continued.

Component	RT ^a (min)	AIL ^b	AIE ^c	<i>T. glabrescens</i> (%)
Oxygenated sesquiterpenes				0.37
Spathulenol	30.140	1577.0	1577.0	0.29
Caryophyllene oxide	30.300	1582.0	1582.3	0.08
Phenolic compounds				14.00
Thymol	21.350	1289.0	1298.6	13.79
Carvacrol	21.499	1298.0	1303.0	0.19
Eugenol	23.155	1356.0	1352.9	0.02
Others				0.62
<i>trans</i> -2-Hexenal	5.987	846.0	850.2	0.03
1-Octen-3-ol	10.010	974.0	979.8	0.45
3-Octanol	10.596	988.0	997.2	0.14
Total				97.76

^a RT: retention time; ^b AIL: arithmetic (retention) index-literature data, and ^c AIE: arithmetic (retention) index experimentally determined on HP-5MS column.

TABLE 2: Antibacterial activity of *T. glabrescens* essential oil, chloramphenicol, geraniol, and thymol ($\mu\text{g/mL}$).

Number	Bacterial species	<i>T. glabrescens</i>		Chloramphenicol		Geraniol		Thymol	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2508.4	5016.8	128.0	512.0	1386.8	2773.6	1561.6	1561.6
2	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	627.1	627.1	4.0	8.0	2773.6	2773.6	24.4	24.4
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	1254.2	1254.2	2.0	2.0	2773.6	5547.2	390.4	390.4
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	5016.8	10033.6	512.0	1024.0	2773.6	5547.2	1561.6	3123.2
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1254.2	2508.4	4.0	64.0	1386.8	1386.8	1561.6	1561.6
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10033.6	20067.2	4.0	16.0	5547.2	11094.4	1561.6	1561.6
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5016.8	5016.8	1024.0	2048.0	2773.6	2773.6	3123.2	6246.4
8	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	5016.8	5016.8	1.0	1.0	5547.2	5547.2	195.2	195.2
9	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	2508.4	2508.4	2.0	4.0	1386.8	1386.8	195.2	195.2
10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	627.1	1254.2	1.0	4.0	1386.8	1386.8	24.4	24.4
11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	627.1	627.1	1.0	8.0	2773.6	2773.6	97.6	97.6
12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2508.4	2508.4	8.0	32.0	2773.6	2773.6	780.8	1561.6
13	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	627.1	1254.2	8.0	8.0	2773.6	2773.6	97.6	97.6

3.4. PCA and HCA Analysis of the Total FIC Indices of the Essential Oil, Geraniol, Thymol, and Chloramphenicol Combinations. PCA and HCA were applied on all FIC data (Figures 1–3) in order to evaluate similar antibacterial behaviour among studied combinations. According to the eigenvalues of the obtained correlation matrix, the PC1 horizontal axis explained 81.14% of the total variance among the tested interactions, while the PC2 vertical axis showed a further 12.77% (Figure 4(a)). The loading plot (Figure 4(b)) illustrates the influence of the FIC values, marked by FIC_A equivalents, responsible for the classification of the interaction in the score plot (Figure 4(c)). Based on the Euclidean distance and dissimilarity ≥ 0.42 (Figure 4(d)), the HCA method indicated two groups of interaction (A and B). Group A, constituted only by *S. aureus* ATCC 29213, was characterized mainly by strong antagonistic interactions with the applied combinations. In this group, only the association thymol-chloramphenicol showed some percent of synergistic interaction. In contrast, in group B, formed by the rest of the examined bacteria strains and studied combinations, mainly synergistic or additive interactions were detected.

4. Discussion

The essential oil of *T. glabrescens* from southeast Serbia belongs to the geraniol/geranyl acetate/thymol chemotype [13]. Chemical polymorphism of the essential oils is a characteristic of the species of the *Thymus* genus. Except for genetic factors, environmental conditions also have an influence on the chemical composition of an essential oil. It was established that the production of phenolic compounds is favoured in warmer and drier climatic zones, while the other, nonphenolic compounds usually accumulate in higher quantities in cooler and damper areas [14]. Geraniol is the dominant component of *T. glabrescens* essential oil from Romania [15]. In Hungarian *T. glabrescens* essential oil, the major compounds were sesquiterpenes: germacrene D, β -caryophyllene, and caryophyllene oxide [13].

The release of cellular content in the treated bacteria led to the hypothesis that the first effect of an essential oil is membrane disruption. However, the fact that some interaction with other targets of the bacterial cell might play a key role in the observed antibacterial effects of the essential oil should not be ignored [16]. The antibacterial activity of *T. glabrescens*

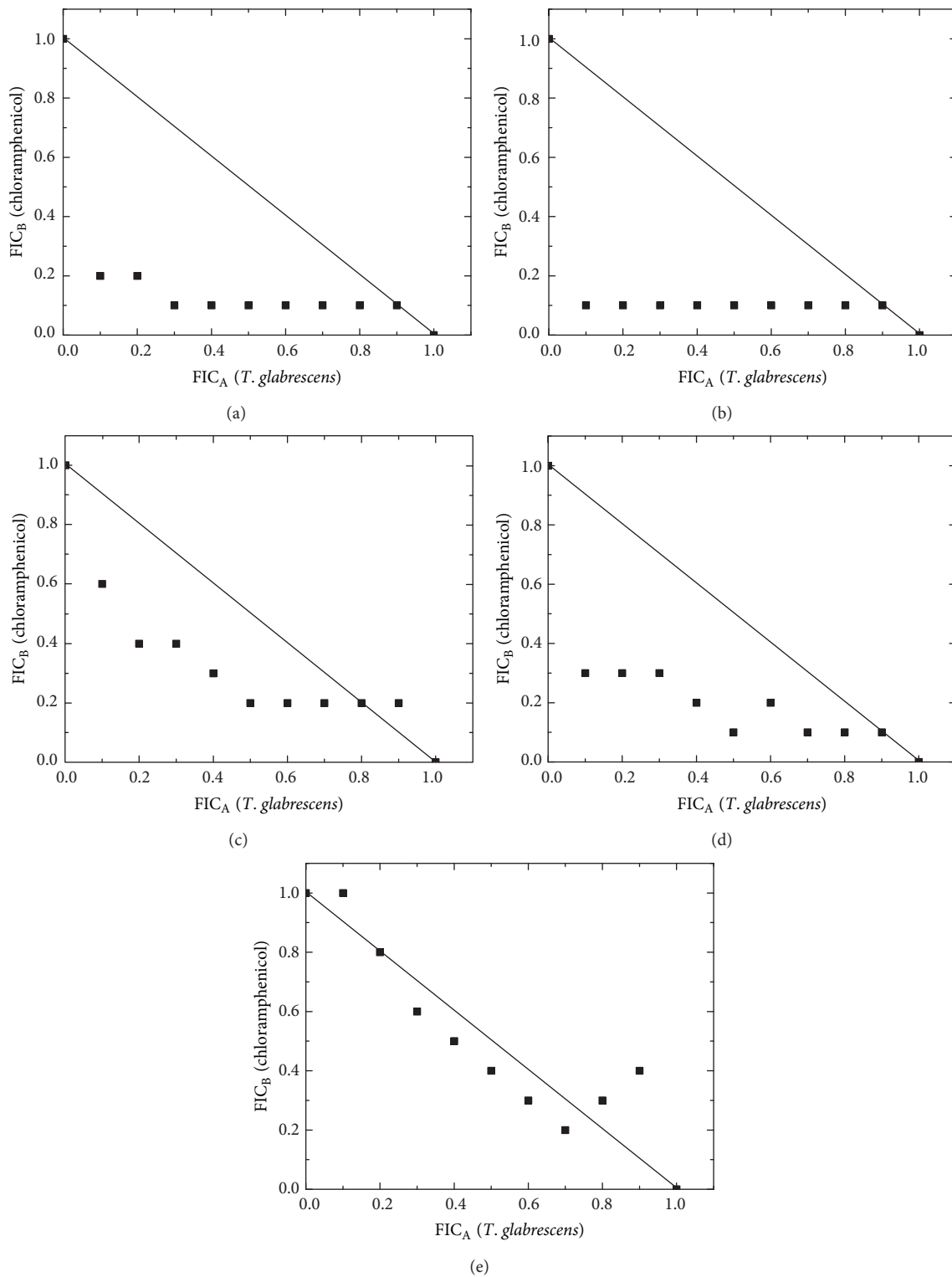


FIGURE 1: The derived isobolograms for the interaction of *T. glabrescens* oil-chloramphenicol and their treatment outcomes against the following: (a) *E. coli* ATCC 25922, (b) *K. pneumoniae* ATCC 700603, (c) *P. mirabilis* ATCC 12453, (d) *P. aeruginosa* ATCC 27853, and (e) *S. aureus* ATCC 29213.

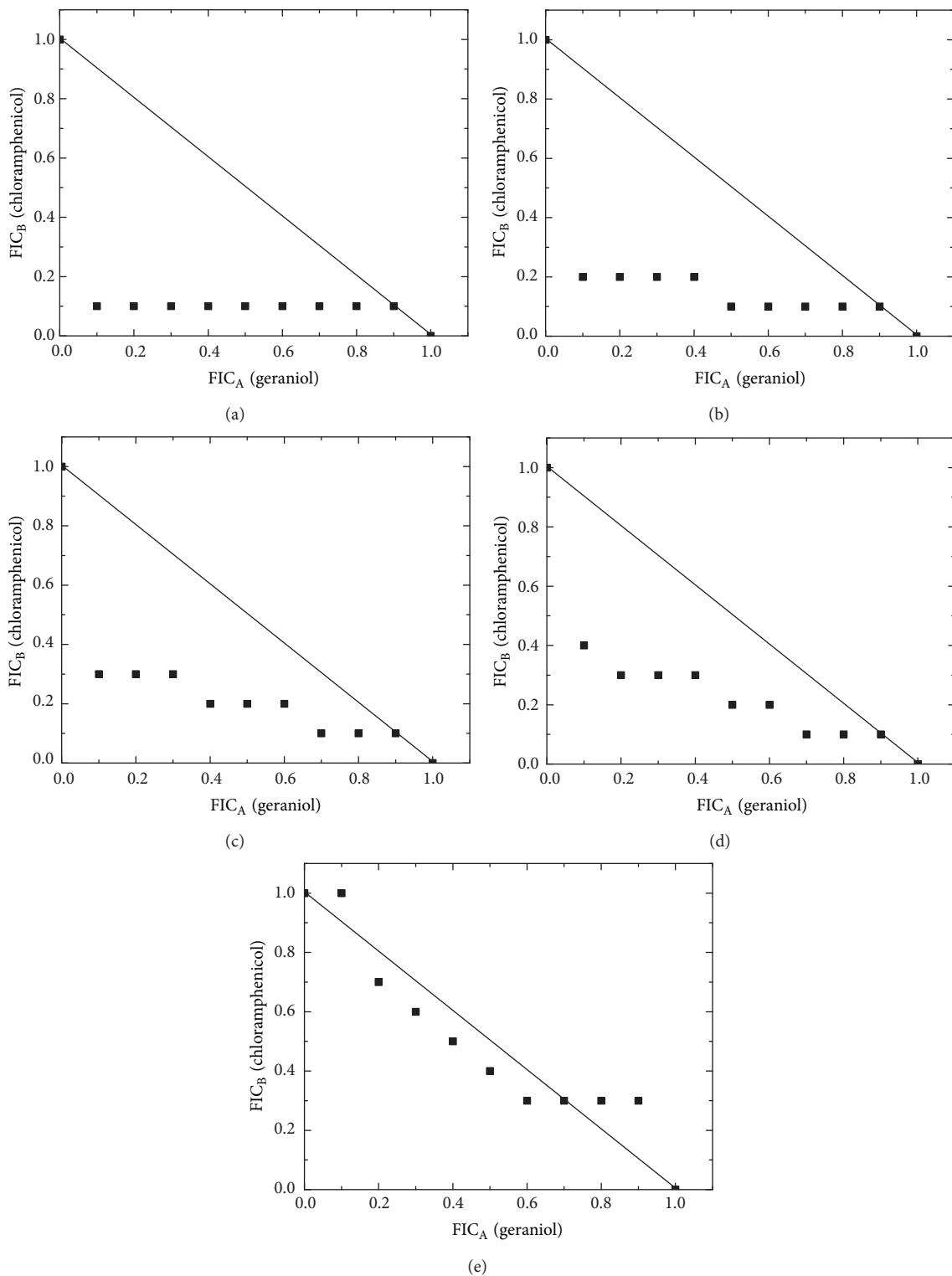


FIGURE 2: The derived isobolograms for the interaction of geraniol-chloramphenicol and their treatment outcomes against the following: (a) *E. coli* ATCC 25922, (b) *K. pneumoniae* ATCC 700603, (c) *P. mirabilis* ATCC 12453, (d) *P. aeruginosa* ATCC 27853, and (e) *S. aureus* ATCC 29213.

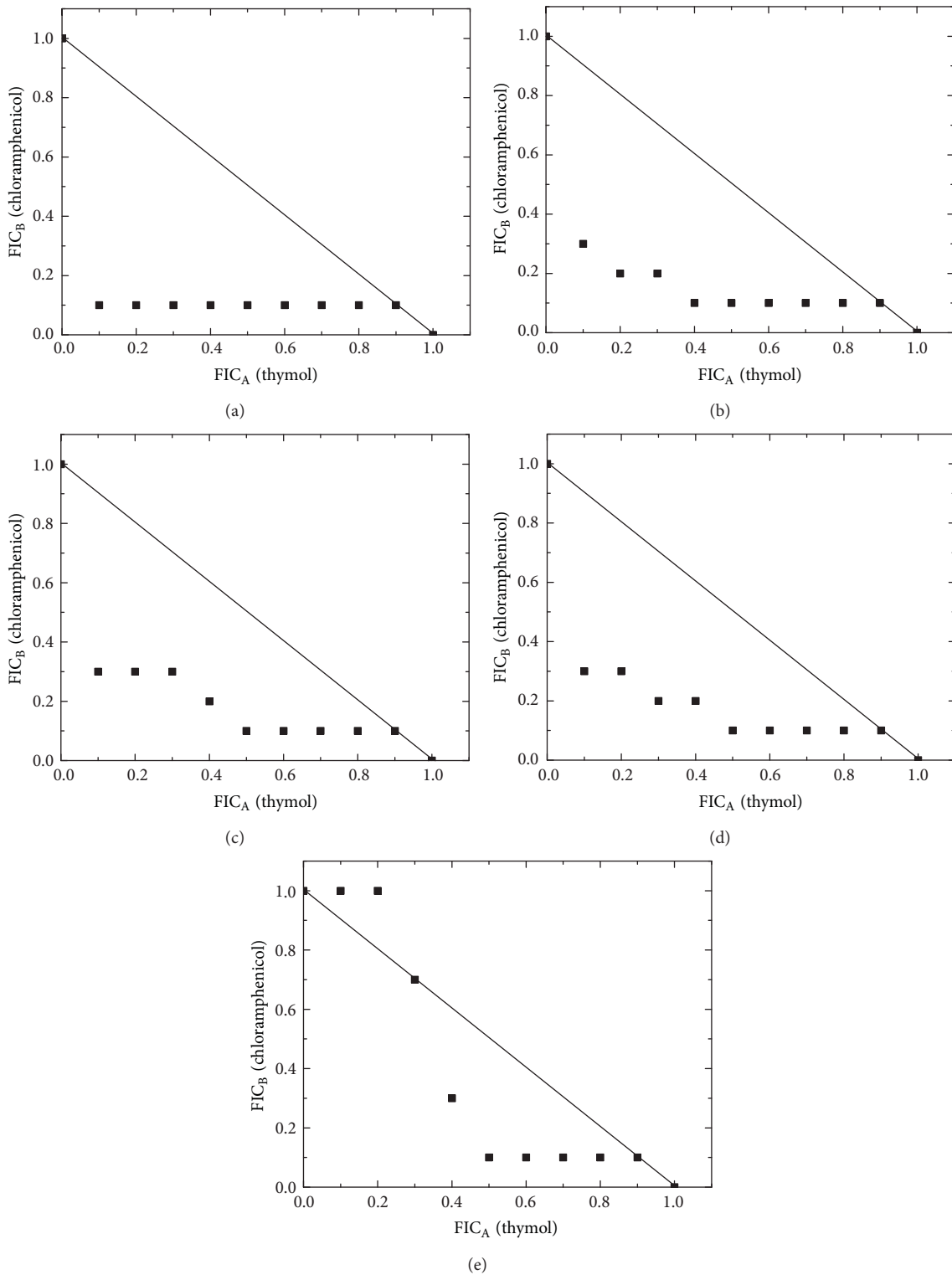


FIGURE 3: The derived isobolograms for the interaction of thymol-chloramphenicol and their treatment outcomes against the following: (a) *E. coli* ATCC 25922, (b) *K. pneumoniae* ATCC 700603, (c) *P. mirabilis* ATCC 12453, (d) *P. aeruginosa* ATCC 27853, and (e) *S. aureus* ATCC 29213.

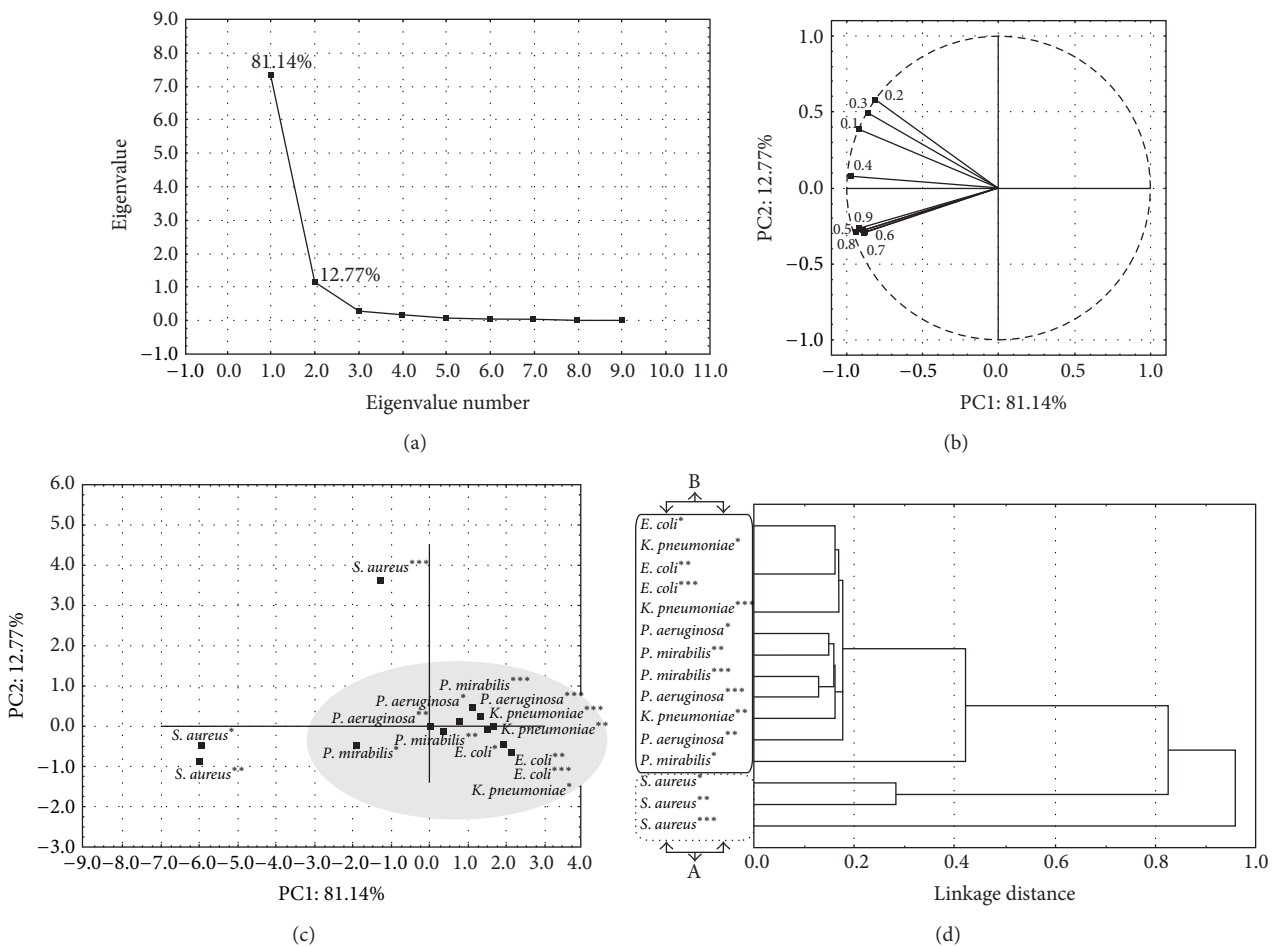


FIGURE 4: PCA and HCA of the antibacterial activity of the studied combinations {*T. glabrescens* oil-chloramphenicol (*); geraniol-chloramphenicol (**); thymol-chloramphenicol (***)} based on their FIC values: (a) eigenvalues of the correlation matrix, (b) the loading plot of the responsible FIC values, (c) the score plot of the examined bacteria, and (d) the corresponding dendrogram. The examined FIC values are presented in Figures 1–3.

essential oil displayed variation among the different bacteria species but remained lower than the activities of the standard antibiotic and thymol. A correlation of the antibacterial activity of the oil and its chemical composition suggests that the activity of the oil could be attributed to the presence of significant concentrations of geraniol and thymol. Therefore, it was decided to study also the antibacterial activity of thymol and geraniol individually and in combination with chloramphenicol.

The essential oil of *T. glabrescens* from Romania inhibited microbial growth in a range of concentrations from 10.8 to 27 $\mu\text{L}/\text{mL}$ [15]. As noted, the main antibacterial agent of the *T. glabrescens* essential oil from southeast Serbia is not only geraniol but also thymol (13.79%); together they represent 36.12% of *T. glabrescens* essential oil. It is interesting to emphasize that the antibacterial activity of *T. pulegioides* essential oil with geraniol (66.59%) as the major constituent is significantly higher in comparison with antibacterial activity of *T. glabrescens* essential oil towards the same bacterial strains [17].

In a study of the inhibitory activity of terpenes on slime producing methicillin resistant strains, the authors found MIC values for geraniol of 5.8 mg/mL against the methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) and 23.4 mg/mL against methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) [18]. In the same study, thymol exhibited inhibitory activities against MRSA and MSSA strains with an MIC value of 3.17 mg/mL. These values are generally higher compared to the values of the antibacterial activity of geraniol and thymol found in the present research.

In the current investigation, it was confirmed that Gram-positive bacteria were more sensitive with all tested antibacterial agents than Gram-negative ones. Most Gram-negative bacteria are intrinsically less susceptible to many antibiotics than are Gram-positive bacteria. This difference could be explained by the presence of an outer membrane in Gram-negative bacteria. The structure and composition of the layer of cells differ greatly between bacteria. On the outer envelope, the cells may have polysaccharide capsules or protein layers

which protect bacteria under unfavourable conditions and affect their adhesion [19].

The interaction of essential oils with antibiotics is one of the novel ways to overcome bacterial resistance. Essential oils are combined with antibiotics in order to improve the antimicrobial effect and to reduce the required antibiotic concentration [20]. In the present study, the antimicrobial activity of *T. glabrescens* essential oil was evaluated in association with chloramphenicol on five bacterial strains. The combination of thyme oil and chloramphenicol against all the tested bacteria, except *S. aureus* ATCC 29213, exhibited a predominantly synergistic effect and decreased the MIC value of chloramphenicol 10-fold (5-fold for *P. mirabilis* ATCC 12453). Based on the present analyses, it can be assumed that in research of the antibacterial effects of essential oil-antibiotic combinations, the choice of Gram-negative or Gram-positive bacterial species is not decisively significant. In other words, the proper essential oil-antibiotic association will act equally stronger or weaker against all Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. In this case, the outer membrane of the Gram-negative bacteria is not a predominant factor of their resistance.

The essential oil of *P. graveolens* and its main components (geraniol and citronellol) exhibited strong synergism with norfloxacin against *B. cereus* and *S. aureus* with FIC indices of 0.50, 0.37, and 0.38, respectively [21]. According to Prashara et al. [22], the antimicrobial action of *Cymbopogon martinii* essential oil (mainly attributed to its geraniol content) against *S. cerevisiae* occurs via a two-step process. The first step involves the passive entry of the oil into the plasma membrane in order to initiate membrane disruption. The second step is reaction with the active sites of the enzymes or action as an H⁺ carrier, thereby depleting the adenosine triphosphate pool.

There are some generally accepted mechanisms of antibacterial interaction that produce synergism, including inhibition of protective enzymes, combination of membrane active agents, sequential inhibition of common biochemical pathways, and the use of membranotropic agents to enhance the diffusion of other antimicrobials [23]. The results obtained in the present study indicate that chloramphenicol, not currently used as a therapeutic agent against Gram-negative bacteria, in combination with an appropriate essential oil, has significant antimicrobial activity, especially against Gram-negative bacteria. Moreover, its minimum effective dose is significantly reduced, and consequently possible toxic side effects are decreased.

The results for the antibacterial activity of a combination of geraniol-chloramphenicol are very similar to the results for a combination of thyme oil-chloramphenicol. The difference is in the increased percentage of interactions that produce synergistic and additive effects, with a decrease in the percentage of antagonistic effects. The combination of geraniol and chloramphenicol against all the tested bacteria, except *S. aureus* ATCC 29213, exhibited predominantly synergistic effects and decreased the MIC value of chloramphenicol 10-fold. The associations of geraniol with penicillin against MRSA and *E. coli* were shown to be indifferent, independently of each antimicrobial activity when they were used alone [24]. In a study of changes in

the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *S. aureus* when geraniol was added to a bacterial suspension, the authors assumed that geraniol increased the growth-inhibitory activity of farnesol but suppressed its ability to damage cell membranes, which is one of the predominant features of the growth-inhibitory activity of farnesol. Their results revealed that terpenes might interact with each other and with bacterial cells to increase or decrease the antibacterial activity of each other [25]. Geraniol significantly increased the efficacy of chloramphenicol by targeting efflux mechanisms and produced significant restoration of susceptibility of the multidrug resistance strain EAEP289 to chloramphenicol by as much as 16-fold [26]. Combinations of geraniol and norfloxacin toward *B. cereus* and *S. aureus* exhibit synergistic effects with FIC indices of 0.50 [21]. The present findings and published data led to the speculation that the antibacterial effect of geraniol may result through interaction with the membrane structure and the function of the bacteria. Furthermore, geraniol might cross the cell membranes penetrating into the interior of the cell and interacting with intracellular sites critical for antibacterial activity [27].

The combination of thymol and chloramphenicol against all the tested bacteria exhibited a predominantly synergistic effect and decreased the MIC value of chloramphenicol 10-fold. Antagonism (only three combinations) was evidenced only against *S. aureus* ATCC 29213. Studies on the antibacterial action of thymol showed that it can cause a disturbance of the cytoplasmic membrane, disrupting the proton motive force, electron flow, and coagulation of cell contents. Thymol also impaired the citrate metabolic pathway and affected the enzymes involved in the synthesis of ATP [28]. The results obtained with the combinations of thymol-penicillin toward MRSA were antagonistic, while association between thymol and penicillin against *E. coli* showed synergistic activity with FIC values of 0.15 [24]. It could be argued that these results correspond to the results of the present research. If the results obtained from the study of the antibacterial activity of geraniol-chloramphenicol and thymol-chloramphenicol associations are compared, a similar pattern can be found. This leads to the speculation that geraniol and thymol in combination could not show any antagonistic effect.

If all combinations of the examined essential oil, geraniol, and thymol with chloramphenicol towards the five bacterial strains are taken into consideration, a possible hypothesis is that the components of thyme essential oil, with the geraniol and thymol as the main active principles, favour the mechanism of action of chloramphenicol, the main effect of which is inhibition of the bacterial enzyme peptidyl transferase, thereby preventing the growth of the polypeptide chain during protein synthesis [29]. It could be stated that all associations against *S. aureus* ATCC 29213 were characterized by a number of ratios of antagonistic interactions. In the PCA and HCA analyses this strain stands out and forms a separate group. In contrast, the other combinations exhibited mostly synergistic or additive interactions toward the other bacterial strains, which may indicate, an already supposed assumption, that the activity of the thyme oil could be attributed to the presence of significant concentrations of geraniol and thymol.

5. Conclusions

In the present study, the chemical composition of *T. glabrescens* essential oil was examined and a correlation among the antibacterial activities of the essential oil-chloramphenicol, geraniol-chloramphenicol, and thymol-chloramphenicol combinations was realized by the utilization of chemometric methods. It was shown that oxygenated monoterpenes, with geraniol as the dominant constituent, were the most abundant compound class of the essential oil of *T. glabrescens* from Southeast Serbia. The researched essential oil exhibited *in vitro* antibacterial activity against all the tested bacterial strains, but the activities were lower than those of the standard antibiotic and thymol. The combination of thyme oil and chloramphenicol produced predominantly synergistic interactions and substantial reductions in the MIC values of chloramphenicol against Gram-negative bacteria, the pharmacological treatment of which is very difficult nowadays. The combinations geraniol-chloramphenicol and thymol-chloramphenicol produced synergistic interaction to a greater extent, compared with the essential oil-chloramphenicol association. All the examined combinations reduced the minimum effective dose of the antibiotic and, consequently, minimized its adverse side effects.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgment

This research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grant nos. 171025 and 176006).

References

- [1] H. F. Chambers and F. R. DeLeo, "Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, no. 9, pp. 629–641, 2009.
- [2] D. L. Miladinović, B. S. Ilić, T. M. Mihajilov-Krstev, N. D. Nikolić, and V. N. Milosavljević, "Antibacterial potential of the essential oil from *Sideritis montana* L., (Lamiaceae)," *Hemijaska Industrija*, vol. 66, no. 4, pp. 541–545, 2012.
- [3] H. Wagner, "Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 1, pp. 34–37, 2011.
- [4] D. L. Miladinović, B. S. Ilić, T. M. Mihajilov-Krstev, N. D. Nikolić, L. C. Miladinović, and O. G. Cvetković, "Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 403, no. 4, pp. 1007–1018, 2012.
- [5] N. Diklić, "Thymus L.," in *Flora of the Republic of Serbia*, M. Josifović, Ed., pp. 475–509, Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia, 1974.
- [6] B. Tan, Y. Liang, L. Yi et al., "Identification of free fatty acids profiling of type 2 diabetes mellitus and exploring possible biomarkers by GC-MS coupled with chemometrics," *Metabolomics*, vol. 6, no. 2, pp. 219–228, 2010.
- [7] R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Ill, USA, 2007.
- [8] CLSI, "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically," Tech. Rep. M07-A08, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Mich, USA, 2009.
- [9] P. F. Dougherty, D. W. Yotter, and T. R. Matthews, "Microdilution transfer plate technique for determining *in vitro* synergy of antimicrobial agents," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 11, no. 2, pp. 225–228, 1977.
- [10] S. F. van Vuuren, S. Suliman, and A. M. Viljoen, "The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 48, no. 4, pp. 440–446, 2009.
- [11] T.-C. Chou and P. Talalay, "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors," *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 22, pp. 27–55, 1984.
- [12] D. L. Wyles, K. A. Kaihara, F. Vaida, and R. T. Schooley, "Synergy of small molecular inhibitors of hepatitis C virus replication directed at multiple viral targets," *Journal of Virology*, vol. 81, no. 6, pp. 3005–3008, 2007.
- [13] H. Simkó, S. Sárosi, M. Ladányi et al., "Studies on occurrence, essential oil data and habitat conditions of Hungarian *Thymus pannonicus* and *Thymus glabrescens* populations," *Medicinal and Aromatic Plants*, vol. 2, no. 1, pp. 1–7, 2013.
- [14] K. Ložienė, J. Šakalytė, A. Paškevičius, and P. R. Venskutonis, "Anti-Candida activity of *Thymus pulegioides* (Lamiaceae) essential oils depends on the plant chemotype," *Herba Polonica*, vol. 54, no. 4, pp. 79–92, 2008.
- [15] M. Pavel, M. Ristić, and T. Stević, "Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity," *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 75, no. 1, pp. 27–34, 2010.
- [16] M. Fadli, A. Saad, S. Sayadi et al., "Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection-bacteria and their synergistic potential with antibiotics," *Phytomedicine*, vol. 19, no. 5, pp. 464–471, 2012.
- [17] D. L. Miladinović, B. S. Ilić, L. C. Miladinović et al., "Antibacterial activity of *Thymus pulegioides* essential oil and its synergistic potential with antibiotics: a chemometric approach," in *Recent Progress in Medicinal Plants*, J. N. Govil, Ed., vol. 38, pp. 101–136, Studium Press, Houston, Tex, USA, 2013.
- [18] N. Gallucci, M. Oliva, E. Carezzano, J. Zygodlo, and M. Demo, "Terpenes antimicrobial activity against slime producing and non-producing staphylococci," *Molecular Medicinal Chemistry*, vol. 21, pp. 132–136, 2010.
- [19] H. L. Alakomi, *Weakening of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane: a Tool for Increasing Microbiological Safety*, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2007.
- [20] H. Wagner and G. Ulrich-Merzenich, "Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals," *Phytomedicine*, vol. 16, no. 2-3, pp. 97–110, 2009.
- [21] A. Rosato, C. Vitali, N. de Laurentis, D. Armenise, and M. Antonietta Milillo, "Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin," *Phytomedicine*, vol. 14, no. 11, pp. 727–732, 2007.
- [22] A. Prashara, P. Hili, R. G. Veness, and C. S. Evans, "Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*," *Phytochemistry*, vol. 63, no. 5, pp. 569–575, 2003.

- [23] S. M. Sokolova, G. N. Buzuk, M. Y. Lovkova, and Y. V. Tyutekin, "Membranotropic compounds and alkaloid accumulation in plants," *Doklady Biochemistry and Biophysics*, vol. 402, no. 1–6, pp. 220–222, 2005.
- [24] N. Gallucci, C. Casero, M. Oliva, J. Zygodlo, and M. Demo, "Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to *beta*-lactam antibiotics," *Molecular Medicinal Chemistry*, vol. 10, pp. 30–32, 2006.
- [25] N. Togashi, Y. Inoue, H. Hamashima, and A. Takano, "Effects of two terpene alcohols on the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *Staphylococcus aureus*," *Molecules*, vol. 13, no. 12, pp. 3069–3076, 2008.
- [26] V. Lorenzi, A. Muselli, A. F. Bernardini et al., "Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, no. 5, pp. 2209–2211, 2009.
- [27] M. A. Abdel Rasoul, G. I. K. Marei, and S. A. M. Abdelgaleil, "Evaluation of antibacterial properties and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic bacteria," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 6, no. 15, pp. 3667–3672, 2012.
- [28] M. Hyldgaard, T. Mygind, and R. L. Meyer, "Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components," *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, no. 12, pp. 1–24, 2012.
- [29] H. E. Hopps, J. C. L. Wisseman, F. E. Hahn, J. E. Smadel, and R. Ho, "Mode of action of chloramphenicol IV.: failure of selected natural metabolites to reverse antibiotic action," *Journal of Bacteriology*, vol. 72, no. 4, pp. 561–567, 1956.

In vitro Antibacterial Activity of *Libanotis montana* Essential Oil in Combination with Conventional Antibiotics

Dragoljub L. Miladinović^{a,*}, Budimir S. Ilić^a, Tatjana M. Mihajilov-Krstev^b, Jovana L. Jović^b and Marija S. Marković^b

^aDepartment of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Niš, 18000 Niš, Serbia

^bDepartment of Biology and Ecology, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš, 18000 Niš, Serbia

dragoljubm@gmail.com

Received: November 14th, 2013; Accepted: December 8th, 2013

The chemical composition and antibacterial activity were examined of *Libanotis montana* Crantz subsp. *leiocarpa* (Heuff.) Soó. (Apiaceae) essential oil. Gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry were used to analyze the chemical composition of the oil. The antibacterial activity was investigated by the broth microdilution method against thirteen bacterial strains. The interactions of the essential oil and three standard antibiotics: tetracycline, streptomycin and chloramphenicol toward five selected strains were evaluated using the microdilution checkerboard assay in combination with chemometric methods: principal components analysis and hierarchical cluster analysis. Sesquiterpene hydrocarbons were the most abundant compound class in the oil (67.2%), with β -elemene (40.4%) as the major compound. The essential oil exhibited slight antibacterial activity against the tested bacterial strains *in vitro*, but the combinations *L. montana* oil–chloramphenicol and *L. montana* oil–tetracycline exhibited mostly either synergistic or additive interactions. These combinations reduced the minimum effective dose of the antibiotics and, consequently, minimized their adverse side effects. In contrast, the association of *L. montana* essential oil and streptomycin was characterized by strong antagonistic interactions against *Escherichia coli* ATCC 25922. In the PCA and HCA analyses, streptomycin stood out and formed a separate group.

Keywords: *Libanotis montana*, Essential oil, Antibacterial activity, Checkerboard assay, Chemometrics, Synergistic interactions.

Bacterial resistance to antibiotics in recent decades has reduced the efficacy of the treatment of infectious diseases worldwide [1]. Thus, a search for new and more sustainable antibiotics is a necessity. Plant extracts and essential oils have become an increasingly important source for the pharmaceutical industry and have great use in medical treatment [2-5]. The antibacterial activity of essential oils could reflect all the molecules present or only those present in high amounts. Neither bacterial resistance nor adaptation to essential oils has been described and secondary effects have not been confirmed [6]. To enhance the efficacy of antibacterial drugs, their combined use with essential oils is a promising strategy [7].

The genus *Seseli*, family Apiaceae, consists of 55 economically important species that are used as foods, spices and preservatives [8]. The Serbian flora recognizes 10 species of *Seseli*. The genus *Libanotis* was separated from the genus *Seseli*. Only one species of the former, *Libanotis montana* Crantz (moon carrot), grows in Serbia; this has two subspecies: *leiocarpa* (Heuff.) Soó (selected plant) and *montana*, [9]. A literature search revealed no data on the antibacterial activity of *S. libanotis* essential oil, especially in combination with conventional antibiotics. Given the importance of *Seseli* species in the human diet, the aim of the present study was to examine the chemical composition and antibacterial activity of *Libanotis montana* Crantz subsp. *leiocarpa* (Heuff.) Soó. (Apiaceae) essential oil and its synergistic potential with conventional antibiotics. To eliminate any kind of subjective analysis, interpretations and discussions of the results, presented by tables and/or graphics, chemometric methods: principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were employed. Furthermore, the use of chemometric methods allows the maximum number of experimental results to be obtained and moreover enables the detection of connections, similarities and differences among variables in the researched experimental system [10].

The yield of *L. montana* essential oil was 0.7%, w/w. Based on GC and GC-MS analysis of moon carrot essential oil, 50 components were identified that represented 93.6% of the total detected constituents (Table 1). The components of the essential oil were separated into six classes: monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes, phenolic compounds and others. Sesquiterpene hydrocarbons were the most abundant compound class in the oil (67.2%); they were dominated by β -elemene (40.4%) and β -caryophyllene (6.5%). Oxygenated sesquiterpenes (12.3%) were mainly dominated by α -bisabolol (6.6%) and caryophyllene oxide (2.8%).

The essential oils were tested for their antibacterial activity by the broth microdilution method to determine MIC and MBC values against thirteen model bacteria (Table 2). The results showed that *L. montana* essential oil possessed slight antimicrobial activities, with MIC values in the range from 337.7 to 43225.6 μ g/mL and MBC values from 675.4 to 43225.6 μ g/mL. Gram-positive bacteria were generally found to be more sensitive than Gram-negative ones. The reference antibiotics were active in the following concentration ranges: tetracycline 0.5 to 1024.0 μ g/mL, streptomycin 0.5 to 256.0 μ g/mL and chloramphenicol 1.0 to 2048.0 μ g/mL.

The results of the possible interactions between the essential oil and the antibiotics are given in Figures 1-3. From 135 tested combinations between *L. montana* oil and the three antibiotics (tetracycline, streptomycin and chloramphenicol), 79 (58.5%) showed synergism, 32 (23.7%) had an additive, and 24 (17.8%) an antagonistic effect. The best antibacterial activities were obtained with the combination of moon carrot oil and chloramphenicol. For this combination, a synergistic effect of 44.3% was recorded, in relation to all the investigated synergistic associations. The highest percentage of the additive effect (40.6%) was registered in the

Table 1: Composition of the essential oil of *Libanotis montana*.

Component	AIL ^a	AIE ^b	<i>L. montana</i> (%)
Monoterpene hydrocarbons			10.9
α -Pinene	932	933	4.2
Camphene	946	949	0.6
Sabinene	969	972	0.1
β -Pinene	974	978	0.9
<i>trans</i> -Isolimonene	980	986	0.05
Myrcene	988	989	0.3
α -Phellandrene	1002	1007	2.2
<i>p</i> -Cymene	1020	1024	0.9
Limonene	1024	1029	1.3
β - <i>trans</i> -Ocimene	1044	1046	0.2
Terpinolene	1086	1085	0.1
Oxygenated monoterpenes			1.8
Eucalyptol	1026	1031	0.6
Linalool	1095	1100	0.6
4-Terpineol	1174	1181	0.05
α -Terpineol	1186	1196	0.1
Carvone	1239	1244	0.02
Piperitone	1249	1254	0.02
Bornyl acetate	1287	1285	0.2
Methyl eugenol	1403	1400	0.2
Sesquiterpene hydrocarbons			67.2
δ -Elemene	1335	1335	0.3
α -Cubebene	1345	1347	0.04
α -Copaene	1374	1376	0.2
β -Elemene	1389	1397	40.4
α -Cedrene	1410	1418	0.06
β -Caryophyllene	1417	1423	6.5
α - <i>trans</i> -Bergamotene	1432	1433	0.02
α -Guaiene	1437	1436	0.1
Aromadendrene	1439	1441	0.1
Seychellene	1444	1450	0.2
β - <i>cis</i> -Farnesene	1440	1454	3.0
α -Humulene	1452	1458	2.6
γ -Murolene	1478	1474	0.6
Germacrene D	1484	1483	3.5
β -Selinene	1489	1491	2.0
α -Selinene	1498	1497	1.7
β - <i>trans</i> -Guaiene	1502	1502	0.4
β -Bisabolene	1505	1509	2.6
γ -Cadinene	1513	1513	0.1
δ -Cadinene	1522	1518	0.7
β -Sesquiphellandrene	1521	1524	0.9
Germacrene B	1559	1560	1.2
Oxygenated sesquiterpenes			12.3
Elemol	1548	1549	1.6
Spathulenol	1577	1578	0.9
Caryophyllene oxide	1582	1584	2.8
α -Cadinol	1652	1656	0.4
α -Bisabolol	1685	1691	6.6
Phenolic compounds			1.1
<i>p</i> -Cresol	1071	1074	1.1
Others			0.3
6-Methyl-5-heptene-2-one	981	984	0.06
<i>p</i> -Methyl anisole	1015	1018	0.06
Palmitic acid	1959	1961	0.2
Total			93.6

^a) AIL=Arithmetic index – literature and library data;

^b) AIE=Arithmetic index experimentally determined on HP-5MS column.

oil/tetracycline combination, while the highest percentage of the antagonistic effect (70.8%) was noted for the oil/streptomycin association. The maximum combination effect of essential oil and antibiotic was expressed toward *P. mirabilis* ATCC 12453. The results of the checkerboard assay showed a synergistic effect of 77.8%, an additive effect of 18.5% and an antagonistic effect of 3.7% for this bacterial strain. The numbers of combinations that exhibited an antagonistic effect were: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (11.1%), *S. aureus* ATCC 29213 (18.5%), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (22.2%) and *E. coli* ATCC 25922 (33.3%).

The combination profiles of *L. montana* essential oil with tetracycline are presented in Figure 1. From 45 combinations, 26 (57.8%) showed synergism, 13 (28.9%) had an additive and 6 (13.3%) an antagonistic effect. *E. coli* ATCC 25922 and *P. mirabilis* ATCC 12453 showed a synergistic pattern for seven ratios (FIC indices in the range 0.32-0.87). Synergy was also noted when tested against *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 29213 (five ratios, FIC indices in the range 0.54-0.87). Combinations with *K. pneumoniae* ATCC 700603 indicated additive (four ratios), antagonistic (three ratios) and synergistic effects (two ratios). Synergy was highest for the ratio FIC_A 0.1 (FIC 0.54).

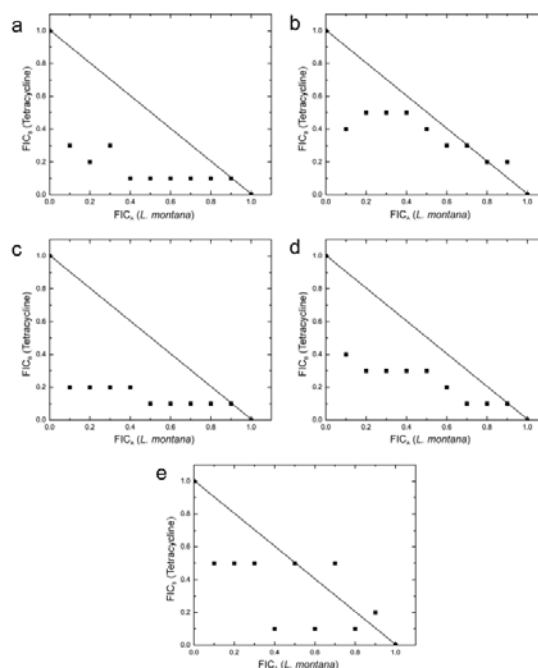


Figure 1: The derived isobolograms for the interaction of *L. montana* oil–tetracycline and their treatment outcomes against: (a) *E. coli* ATCC 25922; (b) *K. pneumoniae* ATCC 700603; (c) *P. mirabilis* ATCC 12453; (d) *P. aeruginosa* ATCC 27853; (e) *S. aureus* ATCC 29213.

The combination profiles of the essential oil with streptomycin are presented in Figure 2. Of all tested combinations, 18 (40.0%) showed synergism, 10 (22.2%) had an additive and 17 (37.8%) an antagonistic effect. *E. coli* ATCC 25922 showed antagonism for all ratios (FIC indices in the range 1.20-2.80). A predominantly synergistic profile was noted against *P. mirabilis* ATCC 12453, while *P. aeruginosa* ATCC 27853 showed a pattern, with six ratios having an antagonistic effect. Synergy was also noted when tested against *K. pneumoniae* ATCC 700603 (six ratios), and *S. aureus* ATCC 29213 (five ratios). It is important to emphasize that the first ratio of *L. montana* oil and streptomycin exhibited antagonism against *S. aureus* ATCC 29213 (FIC 1.20).

The combination profiles of moon carrot essential oil with chloramphenicol are presented in Figure 3. A predominantly synergistic profile was noted against all the studied pathogens. Synergy was best noted for 35 (77.8%) ratios, an additive effect was recorded for 9 (20.0%) ratios and only one combination (2.2%) exhibited an antagonistic effect. To evaluate the correlation between the antibacterial activities of the essential oil-antibiotic combinations, the FIC values were subjected to PCA and HCA analysis [4]. PCA and HCA were applied (Figure 4) to all the FIC data (Figures 1-3) in order to evaluate similar antibacterial interactions of the *L. montana* oil–antibiotic combinations against the tested bacteria. According to the eigenvalues of the obtained correlation matrix, the PC1 horizontal axis explained 81.06% of the total variance among the tested interactions, while the PC2 vertical axis showed a further 11.82% (Figure 4a). The loading plot (Figure 4b) illustrates the influence of the FIC values responsible for the classification of the interaction in the score plot (Figure 4c). Based on the Euclidean distance and dissimilarity ≥ 2.94 (Figure 4d), the HCA method indicated two groups of interaction (A and B). Group A, constituted only by the association of *L. montana* oil–streptomycin, was characterized by strong antagonistic interactions against *E. coli* ATCC 25922. In contrast, in group B, formed by the

Table 2: Antibacterial activity of *L. montana* essential oil and reference antibiotics (µg/mL).

Bacterial species	<i>L. montana</i>		Tetracycline		Streptomycin		Chloramphenicol	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21612.8	43225.6	128.0	256.0	8.0	8.0	128.0	512.0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	675.4	10806.4	1.0	8.0	4.0	4.0	4.0	8.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	675.4	1350.8	1.0	1.0	16.0	16.0	2.0	2.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	21612.8	43225.6	128.0	256.0	64.0	64.0	512.0	1024.0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	10806.4	21612.8	1024.0	1024.0	128.0	256.0	4.0	64.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	5403.2	5403.2	4.0	32.0	8.0	8.0	4.0	16.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	43225.6	43225.6	128.0	256.0	16.0	16.0	1024.0	2048.0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	5403.2	10806.4	0.5	8.0	0.5	0.5	1.0	1.0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	1350.8	1350.8	4.0	4.0	4.0	4.0	2.0	4.0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	337.7	675.4	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	4.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	675.4	675.4	1.0	1.0	0.5	0.5	1.0	8.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2701.6	10806.4	128.0	256.0	4.0	32.0	8.0	32.0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	675.4	675.4	1.0	2.0	1.0	1.0	8.0	8.0

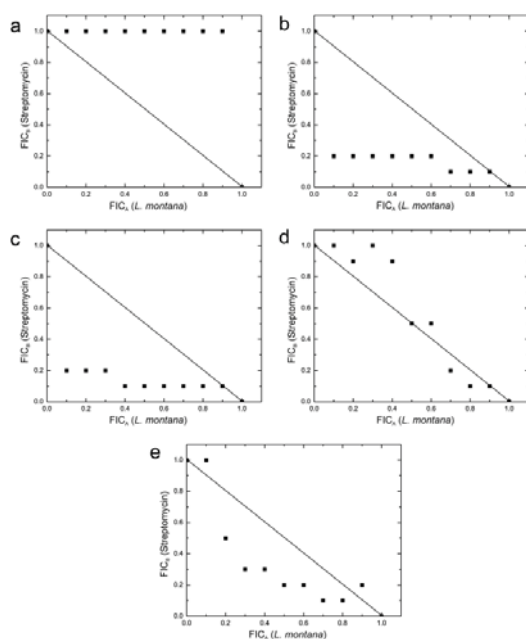


Figure 2: The derived isobolograms for the interaction of *L. montana* oil–streptomycin and their treatment outcomes against: (a) *E. coli* ATCC 25922; (b) *K. pneumoniae* ATCC 700603; (c) *P. mirabilis* ATCC 12453; (d) *P. aeruginosa* ATCC 27853; (e) *S. aureus* ATCC 29213.

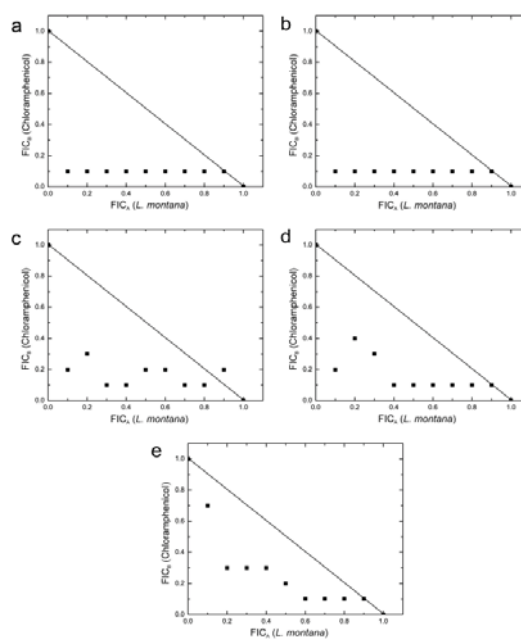


Figure 3: The derived isobolograms for the interaction of *L. montana* oil–chloramphenicol and their treatment outcomes against: (a) *E. coli* ATCC 25922; (b) *K. pneumoniae* ATCC 700603; (c) *P. mirabilis* ATCC 12453; (d) *P. aeruginosa* ATCC 27853; (e) *S. aureus* ATCC 29213.

rest of the examined bacterial strains and *L. montana* oil–antibiotic combinations, mainly synergistic or additive interactions were detected. The yield of essential oil isolated from the dried flowers of *L. montana* was higher in comparison with the yield of essential oils of *Seseli libanotis* from Turkey (0.35%, w/w) and Iran (0.13%, w/w). All three essential oils accumulate sesquiterpenes as the dominant compounds class. The difference between them lies in their main constituent. The oil of *L. montana* from Serbia had β-elemene as its major component, whereas for *S. libanotis* oil from Turkey it was *trans*-caryophyllene (20.4%), and for *S. libanotis* from Iran it was acorenone (35.5%) [11,12]. The differences between the present study and others could be explained by the fact that flowers without leaves were investigated. On the other hand, slight differences could be expected due to diversities between plants growing in different geographical areas and collected at different stages of vegetation.

Terpenoids have a great affinity for cell membranes and, therefore, a high potential to permeate through cell walls of bacteria. The release of cellular content in treated bacteria led to the hypothesis that the first effect of an essential oil is membrane disruption [13]. The antibacterial activity of *L. montana* essential oil displayed significant variation among the different bacterial species but remained much lower than the activities of the standard antibiotics.

The antibacterial activity of *L. montana* essential oil has been mentioned rarely in the literature. Only one work on this topic could be found [14], but the essential oil composition of *S. libanotis* was not examined. Based on the obtained results, it was concluded that the oil was most effective against *S. aureus*. In a study of the antibacterial activity of a methanol extract of the aerial parts of *S. libanotis* against 107 strains from 52 bacterial species the authors concluded that the methanol extract had a broad-spectrum antibacterial activity, especially against *Bacillus* species [11], which corresponds with the present research data. Furthermore, the authors suggest that the antibacterial nature of the methanolic extract is related to the chemical composition of the plants, in particularly to *trans*-caryophyllene, β-farnesene, eusarone and spathulenol. The obtained results could be of interest in relation to the prevention of microbial contamination of foods, which is a similar conclusion arising from the results of the present research. In the current study, a correlation of the antibacterial activity of the oil and its chemical composition suggested that the activity of the oil could be attributed to the presence of high concentrations of β-elemene. β-Elemene and *t*-cadinol, isolated from the oleo-resin of *Commiphora molmol* (Engl.) had inhibitory values in the range 64–256 µg/mL against *S. aureus* strains [15]. In the current investigation, it was confirmed that Gram-positive bacteria were more sensitive than Gram-negative ones. Most Gram-negative bacteria are intrinsically less susceptible

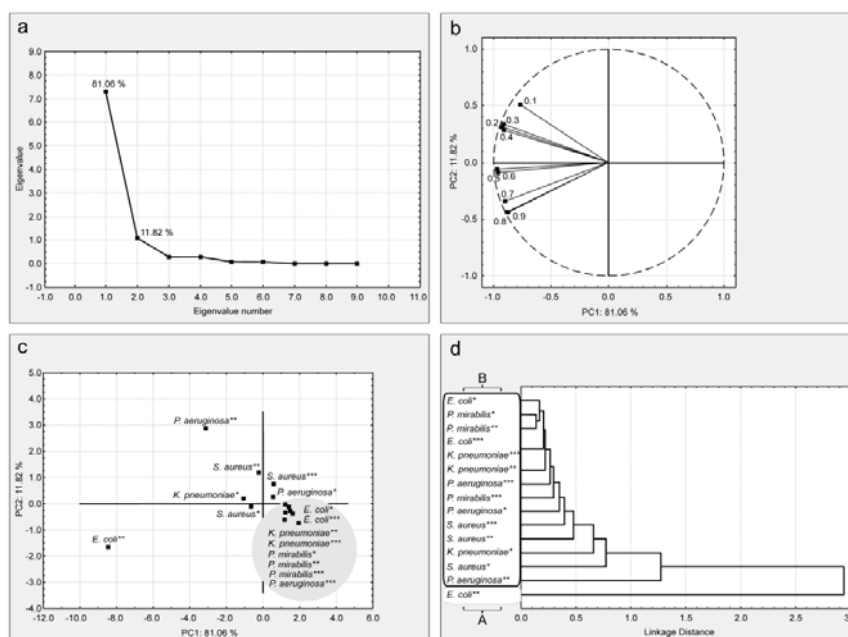


Figure 4: PCA and HCA of the antibacterial activity of the essential oil–antibiotics {tetracycline (*); streptomycin (**); chloramphenicol (***)} based on their FIC values: (a) eigenvalues of the correlation matrix; (b) the loading plot of the responsible FIC values; (c) the score plot of the examined bacteria; (d) the corresponding dendrogram. The examined FIC values are presented in Figures 1-3.

to many antibiotics than Gram-positive bacteria. This difference could be explained by the presence of an outer membrane in Gram-negative bacteria. The structure and composition of the layer of the cells differ greatly between bacteria. On the outer envelope, the cells may have either polysaccharide capsules or protein layers which protect them in unfavorable conditions and affect their adhesion [16].

The interaction of essential oils with antibiotics is one of the novel ways to overcome bacterial resistance. Essential oils are combined with antibiotics in order to improve the antimicrobial effect and to reduce the required antibiotic concentration [4]. Bearing in mind the very slight antibacterial activity of *L. montana* essential oil, the next phase of the research was an estimation of the antimicrobial effect of moon carrot oil in association with the three antibiotics on five bacterial strains. The presented results of the total effects of essential oil/antibiotic combinations fully justifying the purpose of the study and indicated an encouraging fact, *i.e.*, an essential oil with low antibacterial activity may exhibit significant synergistic and additive effects in association with conventional antibiotics. This is even more important if the essential oil is derived from plants used in human diet. The combination of *L. montana* oil and tetracycline against *E. coli* ATCC 25922 and *P. mirabilis* ATCC 12453 exhibited a predominantly synergistic effect and decreased the MIC value of tetracycline 10-fold. In contrast, the oil–tetracycline association against *S. aureus* ATCC 29213 decreased the MIC value of tetracycline 2-fold. Based on the results of the chemometric analyses, it is assumed that in research of the antibacterial effects of essential oil-antibiotic combinations, the choice of Gram-negative or Gram-positive bacterial species is not decisively significant. In other words, the proper essential oil-antibiotic association will act equally strongly or weakly against all Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. In this case, the outer membrane of the Gram-negative bacteria is not a predominant factor of their resistance. There are some generally accepted mechanisms of antibacterial interaction that produce synergism, including inhibition of protective enzymes, combination of membrane active agents, sequential inhibition of common

biochemical pathways and the use of membranotropic agents to enhance the diffusion of other antimicrobials [17].

As already noted, the combinations of the tested essential oil and streptomycin showed a high percentage of antagonistic effects. A very strong antagonistic effect was especially registered against *E. coli* ATCC 25922. It should be mentioned that the essential oil in these combinations had no effect on the decreasing of the MIC values of streptomycin. It is interesting that the intensity of the antagonistic effect was more pronounced with increasing content of the essential oil in combination with streptomycin. In a study that investigated the antibacterial interactions of an ethanol extract of *Ocimum gratissimum* and six antibiotics against Gram-negative bacteria, the authors recorded only antagonistic effects in combinations with streptomycin [18]. The explanation of the mechanism of interactions that produce antagonistic effects has been less studied. Hypotheses discussed in some studies included the use of antibacterial compounds (or mixtures) that act on the same site of the bacteria, and chemical interactions among the antibacterial compounds [19]. Streptomycin exerts its activity by binding to the 16S rRNA of the bacterial ribosome, interfering with the binding of formyl-methionyl-tRNA to the 30S subunit. This prevents initiation of protein synthesis. The overall effect of streptomycin seems to be one of distorting the ribosome so that it can no longer perform its normal functions [20]. By comparing the results obtained for antagonistic effects in this study, only two bacteria, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, appear in numerous combinations. This finding can support the hypothesis that the essential oil and the antibiotics could react with the same bacterial targets. This assumption would relate only to certain bacterial species. In addition, in our opinion, the choice of antibiotics, in terms of their mechanism of action, is an important factor for research of antibacterial activity of essential oil-antibiotic associations.

The combination of *L. montana* oil and chloramphenicol against all the tested bacteria exhibited a predominantly synergistic effect and decreased the MIC value of chloramphenicol 10-fold, for all the

tested bacterial strains. Elucidation of the mechanism of antibacterial action based on the synergism of essential oil/chloramphenicol is not simple. All interactions between antibacterial compounds could change the effectiveness and relationships (synergistic, additive or antagonistic) in competition for the possible primary target. On the other hand, a synergistic multi-target effect could occur by involving proteins, enzymes, ribosomes, nucleic acids, receptors and ion channels [21]. Based on the present results, it could be hypothesized that the antibacterial activity and hence the synergistic effect of *L. montana* essential oil is connected with the high percentage of β -elemene, its major component. According to chemical structure, β -elemene is a derivative of cyclohexane. It is known that cyclic hydrocarbons impair the growth of bacteria and fungi. Cyclohexane inhibited oxygen uptake by intact cells and isolated mitochondria. Studies on isolated mitochondria showed that ATP synthesis was impaired, as well as the uptake of potassium ions and dissipation of the mitochondrial membrane potential were observed. The final effect of the cyclohexane action was disruption of the permeability barrier of the inner mitochondrial membrane [22]. In this way "the door was open" for the performance of chloramphenicol activity. All these considerations prompted the hypothesis that the components of moon carrot essential oil, with β -elemene as the major compound, favor the mechanism of action of chloramphenicol, the main effect of which is inhibition of the bacterial enzyme peptidyl transferase, thereby preventing the growth of the polypeptide chain during protein synthesis [23]. The obtained results indicate that chloramphenicol, not currently used as a therapeutic agent against Gram-negative bacteria, in combination with an appropriate essential oil has significant antimicrobial activity, especially against Gram-negative bacteria. Moreover, its minimum effective dose is significantly reduced, and consequently possible toxic side effects are decreased. If all combinations of the examined essential oil and the antibiotics toward five bacterial strains are taken into consideration, it could be stated that the combinations of moon carrot oil–chloramphenicol and moon carrot oil–tetracycline exhibited mostly synergistic or additive interactions. In contrast, the association of *L. montana* essential oil and streptomycin was characterized by strong antagonistic interactions against *E. coli* ATCC 25922. In the PCA and HCA analyses, streptomycin against this bacterial strain stands out and forms a separate group.

Finally, in the present study, the chemical composition of *L. montana* essential oil was examined and a correlation among the antibacterial activities of the essential oil–antibiotic combinations was realized by the utilization of chemometric methods. It was shown that sesquiterpene hydrocarbons, with β -elemene as the dominant constituent, were the most abundant compound class of the essential oil of *L. montana* from Serbia. The essential oil exhibited slight antibacterial activity against the tested bacterial strains *in vitro*. On the contrary, associations between *L. montana* essential oil and standard antibiotics produced predominantly synergistic interactions against selected bacterial strains. These combinations reduced the minimum effective dose of the antibiotics and, consequently, minimized their adverse side effects. The association of moon carrot oil and chloramphenicol produced a very strong synergistic interaction toward all the tested bacteria, especially Gram-negative bacteria, the pharmacological treatment of which is very difficult nowadays.

Experimental

Plant material and chemicals: The flowers of *Libanotis montana* Crantz subsp. *leiocarpa* (Heuff.) Soó. (*Apiaceae*) were collected in August 2011 from natural populations at the Vidlič mountain, Serbia. A voucher specimen, with the accession number 16548 is

deposited at the Herbarium of the Department of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade-Herbarium Code BEOU. All chemicals, reagents and standards were of analytical reagent grade and were purchased from the Sigma-Aldrich Chemical Company.

Extraction and isolation of oil: The flowers (dried and ground) were subjected to hydro-distillation for 4 h, using a Clevenger-type apparatus to obtain the oil. The resulting essential oil was dried over anhydrous sodium sulfate and stored at 4°C.

Gas chromatography, Gas chromatography/mass spectrometry and Identification of compounds: The GC, GC-MS analyses and identification of oil compounds were performed as previously described [3].

Antibacterial testing: The activity of the essential oil samples was tested towards 13 bacterial strains. Gram-negative bacteria were represented by *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, while the Gram-positive strains were *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. The inocula of the bacterial strains were prepared from overnight broth cultures and the suspensions were adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity (corresponding to 10⁸ CFU/mL, depending on genera-consensus standard by the Clinical and Laboratory Standards Institute) [24].

Micro-well dilution assay: A broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [24], as previously described [3].

Microdilution checkerboard assay: The microdilution checkerboard method is the technique used most frequently to assess antimicrobial combinations *in vitro* [25]. Dilutions of *L. montana* oil and the examined antibiotics were made for evaluation of their combined interactions. The type of interaction was studied on *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 29213. These strains were selected based on their importance in frequently occurring infections. Dilutions from the logarithmic-growth phase of the bacterial culture were prepared and distributed into microtiter trays containing varying concentrations of the different antibiotics and *L. montana* oil. The inoculated trays were incubated at 37°C for 24 h and then evaluated for bacterial growth. Determinations of essential oil–antibiotic interactions were based on the median-effect principle and multiple drug effect equation, as described by Chou and Talalay [26]. Three effects can be highlighted: synergetic, additive or antagonist as a result of the combined effects of the *L. montana* oil and antibiotics. For quantitative purposes the concept of fractional inhibitory concentrations (FIC) is frequently used. In order to assess the activities of combinations of two drugs that are mutually non-exclusive (have different modes of action), the FIC indices were calculated as:

$$FIC = \frac{MIC_{A \text{ combination}}}{MIC_{A \text{ alone}}} + \frac{MIC_{B \text{ combination}}}{MIC_{B \text{ alone}}} + \frac{MIC_{A \text{ combination}} \times MIC_{B \text{ combination}}}{MIC_{A \text{ alone}} \times MIC_{B \text{ alone}}}$$

$$FIC = FIC_A + FIC_B + FIC_A \times FIC_B$$

where MIC_A and MIC_B are the minimum concentrations of the essential oil and examined antibiotic that inhibited the bacterial growth, respectively. The FIC indices were calculated using CalcuSyn (Biosoft), and the results were interpreted as follows: synergistic (<0.90), additive (0.90 ≤ FIC ≤ 1.10), and antagonistic (>1.10) [27].

Statistical analysis of data: The experimental data (FIC values) were analyzed by chemometric methods: principal components analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA), using Mathworks MATLAB.

Acknowledgements - This research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grant No. 171025).

References

- [1] Bockstael K, Van Aerschot A. (2009) Antimicrobial resistance in bacteria. *Central European Journal of Medicine*, **4**, 141-155.
- [2] Miladinović D, Miladinović L, Najman S. (2011) A study of the antioxidants in *Oxytropis pilosa* (L.) DC. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **76**, 505-512.
- [3] Miladinović DL, Ilić BS, Mihajilov-Krstev TM, Nikolić DM, Cvetković OG, Marković MS, Miladinović LC. (2013) Antibacterial activity of the essential oil of *Heracleum sibiricum*. *Natural Product Communications*, **8**, 1309-1311.
- [4] Miladinović DL, Ilić BS, Miladinović LC, Kocić BD, Čirić VM, Stankov-Jovanović VP, Cvetković OG. (2013) Antibacterial activity of *Thymus pulegioides* essential oil and its synergistic potential with antibiotics: a chemometric approach. In *Recent progress in medicinal plants*. Vol. **38**, Govil JN, Bhattacharya S. (Eds). Studium Press LLC, Houston, 101-136.
- [5] Miladinović DL, Ilić BS, Najman SJ, Cvetković OG, Šajnović AM, Miladinović MD, Nikolić ND. (2013) Antioxidative responses to seasonal changes and chemiluminescence assay of *Astragalus onobrychis* leaves extract. *Central European Journal of Chemistry*, **11**, 123-132.
- [6] Rosato A, Piarulli M, Corbo F, Muraglia M, Carone A, Vitali ME, Vitali C. (2010) *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, **17**, 3289-3295.
- [7] Khan MSA, Ahmad I. (2011) Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**, 1083-1094.
- [8] Singh PK, Verma NS, Tandon PK. (2012) Antibacterial activity of essential oils of *Seseli indicum* a wild weed of family Apiaceae. *WebmedCentral*, **3**, 1-5.
- [9] Diklić N. (1974) *Libanotis montana* Crantz. In *Flora of the Republic of Serbia*. Josifović M. (Ed.). Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, 249-252.
- [10] Miladinović DL, Ilić BS, Mihajilov-Krstev TM, Nikolić ND, Miladinović LC, Cvetković OG. (2012) Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **403**, 1007-1018.
- [11] Ozturk S, Ercisli S. (2006) Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Seseli libanotis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 261-265.
- [12] Masoudi S, Esamaeili A, Khalilzadeh MA, Rustaiyan A, Moazami N, Akhgar MR, Varavipoor M. (2006) Volatile constituents of *Dorema aucheri* Boiss., *Seseli libanotis* (L.) W. D. Koch var. *armeniacum* Bordz. and *Conium maculatum* L. three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, **21**, 801-804.
- [13] Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pagès JM, 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**, 464-471.
- [14] Syed M, Chaudhary FM, Bhatti MK. (1989) Antimicrobial activity of essential oils of Umbelliferae family, Part VIII, *Seseli libanotis*, *Ligusticum steuartii* and *Pycnocycla aucheriana* oils. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, **32**, 316-319.
- [15] Rahman MM, Garvey M, Piddock LJ, Gibbons S. (2008) Antibacterial terpenes from the oleo-resin of *Commiphora molmol* (Engl.). *Phytotherapy Research*, **22**, 1356-1360.
- [16] Alakomi HL. (2007) *Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane: A tool for increasing microbiological safety*. University of Helsinki, Finland, 1-124.
- [17] Sokolova SM, Buzuk GN, Lovkova MY, Tyutekin YV. (2005) Membranotropic compounds and alkaloid accumulation in plants. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, **402**, 220-222.
- [18] Nweze EI, Eze EE. (2009) Justification for the use of *Ocimum gratissimum* L in herbal medicine and its interaction with disc antibiotics. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **9**, 1-6.
- [19] Goñi P, López P, Sánchez C, Gómez-Lus R, Becerril R, Nerín C. (2009) Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, **116**, 982-989.
- [20] Busse HJ, Wöstmann C, Bakker EP. (1992) The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. *Journal of General Microbiology*, **138**, 551-561.
- [21] Wagner H, Ulrich-Merzenich G. (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, **16**, 97-110.
- [22] Sikkema J, De Bont JA, Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **59**, 201-222.
- [23] Hopps HE, Wissemann JCL, Hahn FE, Smadel JE, Ho R. (1956) Mode of action of chloramphenicol IV.: Failure of selected natural metabolites to reverse antibiotic action. *Journal of Bacteriology*, **72**, 561-567.
- [24] CLSI M07-A08. (2009) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 1-65.
- [25] Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. (2009) The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*, **48**, 440-446.
- [26] Chou TC, Talalay P. (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, **22**, 27-55.
- [27] Wyles DL, Kaihara KA, Vaida F, Schooley RT. (2007) Synergy of small molecule inhibitors of hepatitis C virus replication directed at multiple viral targets. *Journal of Virology*, **81**, 3005-3008.

8. BIOGRAFIJA

Radna biografija Budimira S. Ilića

Adresa:

Univerzitet u Nišu

Medicinski fakultet

Integrisane akademske studije farmacije

Bulevar Dr Zorana Đinđića br. 81

18000 Niš

Srbija

e-mail: bucabule@yahoo.com; budimir.ilic@medfak.ni.ac.rs



Lični podaci:

Datum i mesto rođenja: 06.02.1982. god., Kruševac, Srbija

Državljanstvo: srpsko

Obrazovanje:

Diplomirani hemičar, Prirodno-matematički fakultet, Odsek za hemiju, Niš (2001/2002-2007, prosečna ocena tokom studiranja, 9.48).

Trenutna pozicija:

Asistent za užu naučnu oblast Hemija na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Nišu.

Akadske aktivnosti:

Realizacija praktične nastave na integrisanim akademskim studijama farmacije, u okviru predmeta Katedre za hemiju, Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Nišu.

Naučno istraživačke aktivnosti:

Učešće na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije br. 142069, „Geohemija tragova metala modernih i drevnih sedimenata od posebnog interesa“ (2008-2010).

Učešće na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije, br. 171025, „Električni probij gasova, površinski procesi i primene“ (2012-).

9. IZJAVE AVTORA



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Hemometrijska analiza rezultata hemijskih i bioloških istraživanja farmakološki značajnih biljaka

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 16. 06. 2014. god.

Аутор дисертације:
Budimir S. Ilić

Потпис докторанда:



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора:

Budimir S. Ilić

Студијски програм:

Hemija

Наслов рада:

Hemometrijska analiza rezultata hemijskih i bioloških istraživanja farmakološki značajnih biljaka

Ментор:

Dragoljub L. Miladinović

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са 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, 16. 06. 2014. god.

Аутор дисертације:

Budimir S. Ilić

Потпис докторанда:



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

Немометријска анализа резултата хемијских и биолошких истраживања фармаколошки значајних биљака
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, 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
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 16. 06. 2014. god.

Аутор дисертације:
Budimir S. Ilić

Потпис докторанда:

_____  _____