

**ANTIBAKTERIJSKO DELOVANJE MEŠAVINA EKSTRAKATA
USNEE, TIMIJANA I ANĐELIKE DOBIJENIH RAZLIČITIM
TEHNOLOŠKIM PROCESIMA PROTIV NEKIH VRSTA
BAKTERIJA ZNAČAJNIH ZA VETERINARSKU MEDICINU***
*ANTIBACTERIAL EFFECTS OF MIXTURES OF EXTRACTS OF USNEA,
THYME AND ANGELICA OBTAINED USING DIFFERENT
TECHNOLOGICAL PROCESSES AGAINST CERTAIN TYPES OF
BACTERIA OF IMPORTANCE IN VETERINARY MEDICINE*

D. Mišić, Irena Žižović, Jasna Ivanović**

U ispitivanjima antibakterijskog delovanja biljnih ekstrakata korišćene su mešavine ekstrakata dobijenih primenom različitih tehnoloških procesa i to: ekstrakt usnee dobijen procesom natkritične ekstrakcije (NKE), ekstrakti anđelike dobijeni procesima natkritične ekstrakcije (NKE) i ultrazvučne ekstrakcije etanolom (UZ) i ekstrakt timijana dobijen procesom hidrodestilacije (HD). Ispitivane su mešavine navedenih ekstrakata u različitim odnosima: U(NKE) i T(HD) u odnosu 1:1, U(NKE) i T(HD) u odnosu 7:3, U(NKE), T(HD) i A(NKE) u odnosu 2:2:1 i U(NKE), T(HD) i A(UZ) u odnosu 2:2:1. Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno 15 sojeva bakterija iz rodova Staphylococcus, Streptococcus i Enterococcus, uključujući sojeve MRSA, sojeve VRE kao i referentne sojeve S.pyogenes ATCC 19615, S.agalactiae ATCC 27959 i S.aureus ATCC 11632. Antibakterijsko delovanje mešavina biljnih ekstrakata ispitivano je primenom mikrodilucione metode u bujonu, a ispitivane su koncentracije mešavina od 1,25 µg/mL do 1280 µg/mL. Najjače antibakterijsko delovanje pokazale su mešavine usnee (NKE) i timijana (HD) u odnosu 1:1 i 7:3 sa dobijenim vrednostima MIC od 5 µg/mL do 160 µg/mL, ali je vrednost MIC navedenih mešavina za najveći broj sojeva iznosila 40 µg/mL. Nešto slabije delovanje pokazale su ostale ispitivane mešavine ekstrakata sa dobijenim vrednostima MIC od 10 µg/mL do 320 µg/mL. S obzirom na dobijene vrednosti MIC

* Rad primljen za štampu 15. 03. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Dušan Mišić, docent, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. Irena Žižović, docent, mr sci. Jasna Ivanović, Katedra za organsku hemijsku tehnologiju, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu

kao i na osnovu rezultata ranijih istraživanja, može se zaključiti da su sve ispitivane mešavine biljnih ekstrakata pokazale veoma jako antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve bakterija.

Ključne reči: ekstrakti, mešavine, antibakterijsko delovanje

Uvod / Introduction

Zbog nedostatka novih antibiotika na tržištu lekova kao i zbog sve učestalije pojave infekcija kod ljudi i životinja izazvanih patogenim bakterijama koje su rezistentne na sve postojeće antibiotike, u cilju pronalaženja novih antibakterijskih lekova značajno su intenzivirana ispitivanja antibakterijskog delovanja ekstrakata biljaka. Već decenijama je poznato da mnoge biljke, tj. njihovi ekstrakti imaju dobro antimikrobno delovanje, kako na bakterije tako i na gljivice i viruse (Glisic i sar., 2007; Burt, 2004). Uprkos tome, primena biljnih ekstrakata u farmaceutskoj industriji i kliničkoj veterinarskoj i medicinskoj praksi je vrlo ograničena. Razlog za to su tehnološki procesi dobijanja ekstrakata koji uključuju i primenu aditiva, najčešće rastvarača samih ekstrakata. U tu svrhu se koriste supstance koje uglavnom imaju toksično delovanje na organizam domaćina (acetone, hloroform, etar, etil-alkohol, metil-alkohol, itd.). Osim toga, aditivi imaju i antibakterijsko delovanje pa njihovo prisustvo ometa precizno tumačenje i procenu jačine antibakterijskog delovanja samog ekstrakta. Stoga su *in vitro* ispitivanja antimikrobnog delovanja biljnih ekstrakata relativno teška i dugotrajna; povezana su sa teškoćama u interpretaciji rezultata zbog obavezne primene matematičkih korekcija dobijenih rezultata u odnosu na procentualno prisustvo aditiva u ekstraktu, itd.

Poslednjih godina dvadesetog veka razvijena je nova tehnologija ekstrakcije aktivnih supstancija iz biljnog materijala uz primenu natkritičnih fluida, takozvana natkritična ekstrakcija (NKE) (Zizovic i sar., 2007). U procesima NKE najčešće se koristi ugljenik(IV)-oksid zato što je netoksičan, nezapaljiv, hemijski inertan, lako dostupan i ima relativno niske kritične parametre ($p_c=7,38$ MPa i $t_c=31,1^\circ\text{C}$) što je od izuzetnog značaja za industrijsku primenu. Podešavanjem procesnih parametara (p , t) moguće je vršiti podešavanje selektivnosti natkritičnog fluida prema željenoj grupi jedinjenja. Nakon završenog procesa ekstrakcije, sniženje pritiska i prevođenje natkritičnog ugljenik(IV)-oksida u gasovito stanje omogućavaju njegovo lako i potpuno uklanjanje iz rastvora tako da se kao krajnji proizvod NKE dobija biljni ekstrakt koji ne sadrži tragove rastvarača. Sam proces NKE odvija se najčešće na nižim temperaturama od 40 do 60°C čime se izbegava termička degradacija termolabilnih komponenata biljke. Jedinim nedostatak primene NKE u industrijskim uslovima, u odnosu na konvencionalne metode, jesu veća investiciona ulaganja u opremu zbog rada na povišenim pritiscima (10 - 40 MPa). Međutim, sami troškovi proizvodnje su znatno manji, proces je jed-

nostavniji i energetski isplativiji, a dobijeni proizvod je kvalitetniji i ima veću cenu na tržištu.

Stoga u poslednjih nekoliko godina u naučnoj i stručnoj javnosti vlada veliko interesovanje za mogućnosti primene natkritičnih ekstrakata biljaka kao novih antimikrobnih sredstava ili čak i kao aditiva hrani koji bi svojim prisustvom sprečili razmnožavanje prisutnih mikroorganizama, a time i kvarenje hrane (Mišić i sar., 2008). Uprkos tome, otkriveno je da ekstrakti nekih biljaka dobijeni natkritičnom ekstrakcijom imaju slabije delovanje od ekstrakata istih biljaka dobijenih drugim procesima. Zato su u ovom ispitivanju korišćene mešavine ekstrakata nekih biljaka dobijene različitim tehnološkim procesima. Biljke koje su odabrane za proizvodnju ekstrakata su usnea, anđelika i timijan, a razlog za odabir ovih biljaka jeste njihovo jako antimikrobno delovanje koje je dokazano u ranijim ispitivanjima.

Lišaj usnee ili jevrejska brada (*Usnea barbata* L.) pripada familiji *Parmeliaceae* i raste na stablu i granama različitih drvenastih vrsta, posebno na četinarima. Ovaj lišaj čini kombinacija dve vrste organizama – gljiva i algi, koje žive u simbiotskoj zajednici. Ekstrakt usnee i njegova aktivna komponenta, usninska kiselina, imaju izraženo antibakterijsko, antifungicidno i antivirusno delovanje (Weckesser i sar., 2007; Najdenova i sar., 2001; Dorman i sar., 2000). Pokazalo se da usninska kiselina pored snažnog antibakterijskog delovanja takođe sprečava rast nekih ćelija tumora (Yamamoto, 1995). Interesantno je da se usnea još uvek ne koristi u farmaceutskoj industriji uprkos dokazanom antimikrobno i antitumorskom delovanju.

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) je višegodišnja žbunasta biljka iz familije *Lamiaceae* koja potiče iz oblasti zapadnog Sredozemlja, ali se danas gaji u više zemalja zbog lista i nadzemnog dela iz kojih se dobija etarsko ulje timijana. Eтарsko ulje timijana zbog jakog antibakterijskog dejstva ulazi u sastav preparata protiv kašlja, za ispiranje sluzokože usta i grla, lekova protiv teškog varenja. Najzasupljenija aktivna komponenta u etarskom ulju i ekstraktima timijana je timol (Kišgeci, 2008). Sam timol ima izvanredno antibakterijsko delovanje ali je njegova primena ograničena zbog citotoksičnog delovanja.

Anđelika (*Angelica archangelica* L.) je dvogodišnja zeljasta biljka koja pripada familiji *Apiaceae*. Eтарsko ulje dobijeno iz korena ulazi u sastav preparata za poboljšanje varenja i apetita kod ljudi i životinja. Aktivne komponente etarskog ulja anđelike su α -felandren, α -pinen i p-cineol (Kišgeci, 2008).

U ranijim istraživanjima (Mišić i sar., 2009), ustanovljeno je da ekstrakt timijana dobijen procesom hidrodestilacije ima jače antibakterijsko delovanje nego ekstrakt iste biljke dobijen u procesu natkritične ekstrakcije. Za razliku od toga, u prethodnim istraživanjima (Mišić i sar., 2009) ustanovljeno je da ekstrakt anđelike dobijen u procesu natkritične ekstrakcije ima značajno jače delovanje nego ekstrakt anđelike dobijen procesom hidrodestilacije ali značajno slabije delovanje nego ekstrakt anđelike dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom pomoću etanola. Stoga je izvršeno ispitivanje delovanja nekoliko kombinacija mešavina

navedenih biljaka dobijenih različitim tehnološkiim procesima u cilju otkrivanja postojanja eventualnog sinergističkog delovanja različitih ekstrakata.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Materijal / *Material*

Za pripremanje ekstrakata korišćeni su listovi timijana (*Thymus vulgaris* L., Vojvodina, Bavanište, 2008), koren anđelike (*Angelica silvestris*, područje centralne Srbije, 2008) i lišaj usnee (*Usnea barbata* L., Makedonija, 2008).

U ispitivanjima antibakterijskog delovanja biljnih ekstrakata korišćene su mešavine ekstrakata dobijene primenom različitih tehnoloških procesa i to: ekstrakt usnee dobijen procesom natkritične ekstrakcije (NKE), ekstrakti anđelike dobijeni procesima natkritične ekstrakcije (NKE) i ultrazvučne ekstrakcije etanolom (UZ) i ekstrakt timijana dobijen procesom hidrodestilacije (HD). Ispitivane su mešavine navedenih ekstrakata u različitim odnosima: U(NKE) i T(HD) u odnosu 1:1, U(NKE) i T(HD) u odnosu 7:3, U(NKE), T(HD) i A(NKE) u odnosu 2:2:1 i U(NKE), T(HD) i A(UZ) u odnosu 2:2:1. Ispitivanja su vršena sa navedenim mešavinama u koncentracijama od 1,25 µg/mL do 1280 µg/mL.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 15 sojeva bakterija iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus*, uključujući sojeve MRSA, sojeve VRE i referentne sojeve *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 27959 i *S.aureus* ATCC 11632. Svi ispitivani sojevi bakterija izolovani su iz uzoraka briseva kože, očiju i ušiju poreklom od pasa, mačaka i ljudi obolelih od infekcije kože i konjunktivitisa, osim jednog soja VRE koji je izolovan iz uzorka mozga uginulog psa, jednog soja *E. faecalis* koji je izolovan iz uzorka jetre uginulog laboratorijskog miša i jednog soja *Streptococcus uberis* koji je izolovan sa kože zamorca. Uzorci briseva dostavljani su na rutinsku mikrobiološku analizu u laboratoriju za bakteriologiju i mikologiju Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu tokom 2007, 2008. i 2009. godine.

Za izolaciju i identifikaciju bakterija korišćeni su krvni agar sa 6% ovčije krvi (bioMerieux), Columbia agar sa kolistinom i nalidiksičnom kiselinom (Becton Dickinson) i hranljivi bujon (BioLab). Za tipizaciju sojeva bakterija po vrstama upotrebljen je BBL Crystal gram positive id kit (Becton Dickinson) i Api Staph ID kit (bioMerieux). Antibakterijsko delovanje ekstrakata timijana ispitivano je u mikrotitracionim pločama sa "U" dnom (Spektar) uz upotrebu Mueller Hinton bujona sa korigovanom količinom jona kalcijuma i magnezijuma (Becton Dickinson) uz dodatak indikatora 1,6% brom krezol ljubičastog (Merck) u finalnoj količini od 0,1 mL/100 mL podloge. Pre upotrebe, biljni ekstrakti rastvarani su u nerazblaženom DMSO (dimetilsulfoksid, Sigma).

Metode / Methods

Natkritična ekstrakcija usnee, anđelike i timijana izvedena je na temperaturi od 40°C i pod pritiskom od 11,5 MPa u prethodno opisanom (Zizovic i sar., 2007) laboratorijskom postrojenju za NKE Autoclave Engineers SCE Screening System, sa ugljenik(IV)-oksidom kao natkritičnim fluidom. Hidrodestilacija timijana izvedena je u laboratorijskoj aparaturi za hidrodestilaciju po Klevendžeru u trajanju od 4 sata. Za ultrazvučnu ekstrakciju sa 96 % etanolom korišćeno je ultrazvučno kupatilo Bandelin Sonorex RK 52 (35 kHz, 60 W, 1,8 L). Nakon 45 min ekstrakcije, rastvarač je uparavan pomoću rotacionog vakuum uparivača.

Izolacija i identifikacija bakterija vršena je primenom konvencionalnih mikrobioloških metoda. Antibakterijsko delovanje ekstrakata ispitivano je primenom mikrodilucione metode u bujonu na osnovu CLSI standarda (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) iz 2008. godine.

Rezultati / Results

Rezultati ispitivanja antibakterijskog delovanja ekstrakata timijana prikazani su u tabeli 1. Najjače antibakterijsko delovanje pokazale su mešavine usnee (NKE) i timijana (HD) u odnosu 1:1 i 7:3. Mešavina usnee (NKE) i timijana (HD) u odnosu 1:1 pokazala je izrazito jako antibakterijsko delovanje na soj *S. pseudintermedius* poreklom sa kože psa sa dobijenom vrednosti MIC od samo 5 µg/mL. Takođe, vrlo jako antibakterijsko delovanje navedena mešavina ekstrakata ispoljila je na soj *S. pseudintermedius* poreklom iz uha psa, sa dobijenom vrednosti MIC od 10 µg/mL. Vrednosti MIC navedene mešavine ekstrakata za najveći broj sojeva iznosile su od 40 do 80 µg/mL, što je takođe dobro antibakterijsko delovanje. Najslabije delovanje ispitivana mešavina ekstrakata imala je na sojeve *Streptococcus agalactiae* ATCC 2795 i *Streptococcus equi* ssp. *zooepidermicus* poreklom sa kože psa sa dobijenom vrednosti MIC od 160 µg/mL. Ispitivana mešavina U(NKE) i T(HD) u odnosu 7:3 imala je podjednako jako delovanje na većinu ispitivanih sojeva bakterija sa dobijenim identičnim vrednostima MIC. Razlike su se ipak javile kod 3 soja stafilokoka za koje su dobijene vrednosti MIC mešavine U(NKE) i T(HD) u odnosu 7:3 bile dvostruko veće ili dvostruko manje od vrednosti MIC mešavine ovih biljaka u odnosu 1:1. Srednje jako antibakterijsko delovanje imale su mešavine U(NKE), T(HD) i A(NKE) u odnosu 2:2:1 i U(NKE), T(HD) i A(UZ) u odnosu 2:2:1 sa dobijenim vrednostima MIC od 10 µg/mL do 320 µg/mL. Međutim, i ove mešavine ekstrakata su imale izraženo antibakterijsko delovanje na neke od ispitivanih sojeva stafilokoka sa dobijenim vrednostima MIC od 10 do 20 µg/mL.

Najčešće dobijena vrednost MIC svih ispitivanih mešavina za većinu ispitivanih sojeva iznosila je 40 µg/mL.

Tabela 1. *Dobijene vrednosti MIC ispitivanih mešavina ekstrakata / Table 1. Obtained MIC values for examined extract mixes*

	Ispitivani soj / <i>Examined strain</i>	U(NKE):T(HD) 1:1	U(NKE):T(HD) 7:3	U(NKE):T(HD): A(NKE) 2:2:1	U(NKE):T(HD): A(UZ) 2:2:1
		VREDNOSTI MIC / <i>MIC VALUES</i> (µg/mL)			
1.	<i>S.pseudintermedius</i> (bris uha psa) / (<i>ear swab, dog</i>)	10	5	10	10
2.	<i>S.aureus</i> (bris nosa, čovek) / (<i>nose swab, human</i>)	80	80	80	80
3.	<i>S.pseudintermedius</i> (bris koža psa) / (<i>skin swab, dog</i>)	5	10	10	10
4.	<i>S.pseudintermedius</i> (bris koža psa) / (<i>skin swab, dog</i>)	160	10	320	80
5.	<i>S.aureus</i> (bris rane psa) / (<i>wound swab, dog</i>)	40	40	40	40
6.	<i>S.haemolyticus</i> (bris uha mačke) / (<i>ear swab, cat</i>)	80	40	160	160
7.	<i>S.aureus</i> ATCC 11632	80	80	80	40
8.	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	40	40	320	320
9.	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 27956	160	160	320	320
10.	<i>Enterococcus</i> sp. (ljudski urin) / (<i>human urine</i>)	40	40	80	40
11.	<i>Enterococcus</i> sp. (jetra miša) / (<i>mouse liver</i>)	40	40	20	40
12.	<i>Enterococcus</i> sp. (ljudski urin) / (<i>human urine</i>)	80	40	40	320
13.	<i>Enterococcus</i> sp. (mozak, štene) / (<i>brain, puppy</i>)	40	40	40	40
14.	<i>Streptococcus equi</i> ssp <i>zooepidermicus</i> (bris kože psa) / (<i>skin swab, dog</i>)	160	160	160	160
15.	<i>Streptococcus uberis</i> (bris kože zamorca) / (<i>skin swab, guinea-pig</i>)	80	40	40	40

Diskusija / Discussion

Na osnovu ispitivanja Mišića i saradnika iz 2009. godine, ekstrakt timijana dobijen hidrodestilacijom imao je značajno slabije delovanje na stafilokoke, streptokoke i enterokoke sa dobijenim vrednostima MIC od 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do 1280 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dok su mešavine ovog ekstrakta sa natkritičnim ekstraktom usnee imale značajno bolje antibakterijsko delovanje sa dobijenim manjim vrednostima MIC.

Na osnovu ranijih ispitivanja istih autora, natkritični ekstrakt anđelike imao je relativno slabo antibakterijsko delovanje na *Staphylococcus* vrste sa dobijenim vrednostima MIC od 320 mg/mL do 640 mg/mL . Slično tome, ekstrakt anđelike dobijen procesom ultrazvučne ekstrakcije pomoću etanola imao je takođe relativno slabo delovanje na stafilokoke sa dobijenim vrednostima MIC od 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Međutim, navedeni ekstrakti u mešavini sa ekstraktima timijana i usnee imali su jače delovanje na ispitivane bakterije.

Može se reći da su svi upotrebljeni ekstrakti, tj. njihove mešavine u ovom ispitivanju imale približno podjednako jako antibakterijsko delovanje na većinu ispitanih sojeva bakterija. Ovo je naročito uočljivo kod soja *Staphylococcus aureus* izolovanog iz brisa nosa obolelog čoveka jer su na taj soj sve mešavine identično delovale sa dobijenom vrednosti MIC od 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Slično tome, na soj *Staphylococcus aureus* poreklom sa kože bolesnog psa sve primenjene mešavine delovale su podjednako jako sa dobijenom vrednosti MIC od 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a na soj *Streptococcus equi* ssp. *zooepidermicus* su svi ekstrakti imali identično delovanje sa dobijenom vrednosti MIC od 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Vrlo značajne razlike u delovanju mešavina ekstraktata ispoljile su se na soj *Staphylococcus pseudintermedius* poreklom sa kože bolesnog psa (soj broj 4 u tabeli 1) gde su dobijene četiri potpuno različite vrednosti MIC svake od mešavina, 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pretpostavka je da je ovo neujednačeno delovanje ekstraktata posledica karakteristika samog soja.

Može se reći da su ispitivani ekstrakti tj. njihove mešavine najslabije delovale na streptokoke i enterokoke, jer su dobijene vrednosti MIC svih mešavina ekstraktata za većinu sojeva iznosile 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Međutim, bez obzira na dokazano solidno antibakterijsko delovanje ekstraktata nekih biljaka, njihova primena u kliničkoj veterinarskoj i medicinskoj praksi je i dalje limitirana zbog citotoksičnog delovanja ekstraktata većine vrsta biljaka u niskim koncentracijama. Problem citotoksičnog delovanja i ne bi bio toliko izražen ukoliko ekstrakti ne bi delovali toksično na ćelije domaćina u koncentracijama koje odgovaraju vrednostima MIC tih ekstraktata. Međutim, upravo je to problem što ekstrakti koji imaju dobro antibakterijsko delovanje pokazuju i citotoksično delovanje u koncentracijama nižim nego što su vrednosti MIC tih ekstraktata (Mišić i sar., 2009).

Tehnološki proces takođe značajno utiče na antibakterijsku aktivnost dobijenog ekstrakta. To se može uočiti na primeru smeše U(NKE):T(HD):A(NKE) koja je za neke sojeve imala veću vrednost MIC, tj. slabije antibakterijsko de-

lovanje od smeše U(NKE):T(HD):A(UZ). Slično tome, na osnovu rezultata dobijenih u ranijim istraživanjima (Mišić i sar., 2009) primećeno je da je etarsko ulje timijana dobijeno procesom hidrodestilacije imalo jače antibakterijsko delovanje na neke sojeve od ekstrakta timijana dobijenog procesom NKE.

Zaključak / Conclusion

S obzirom na dobijene vrednosti MIC kao i na osnovu rezultata ranijih istraživanja, može se zaključiti da su sve ispitivane mešavine biljnih ekstrakata pokazale veoma jako antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve bakterija.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Istraživanje je omogućeno finansijskom podrškom Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekat TR 19037).

Literatura / References

1. Burt S. Essential oils- their antimicrobial properties and potential application in foods – a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-53.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, 2008.
3. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308-16.
4. Glišić S, Mišić D, Stamenić M, Žižović I, Ašanin R, Skala D. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carrot Fruit Essential Oil – Chemical Composition and Antimicrobial Activity, *Food Chemistry* 2007; 105: 346-52.
5. Kišgeci J. Lekovite i aromatične biljke, Partenon i Srpska književna zadruga, Beograd, 2008; 155, 234.
6. Mišić D, Nišavić J, Žižović I, Ivanović J. Antibakterijsko delovanje i citotoksični efekat natkritičnog ekstrakta timijana i ekstrakta timijana dobijenog procesom hidrodestilacije. *Veterinarski glasnik* 2009; 63(1-2):17-27.
7. Mišić D, Ašanin R, Ivanović J, Žižović I. Investigation of antibacterial activity of supercritical extracts of plants, as well as of extracts obtained by other technological processes on some bacteria isolated from animals. *Acta veterinaria* 2009; 59(5-6): 557-68.
8. Mišić D, Žižović I, Stamenić M, Ašanin R, Ristić M, Petrović SD, Skala D. Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling. *Biochemical Engineering Journal* 2008; 42: 148-52.
9. Najdenova V, Lisickov K, Đarmati Z. Antimicrobial activity and stability of usnic acid and its derivatives in some cosmetic products, *Olaj, Szapan, Kozmetika* 2001; 158-60.
10. Weckessera S, Engela K, Simon-Haarhausa B, Wittmerb A, Pelzb K, Schempp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* 2007; 14; 508-16.
11. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their

active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. Chem Pharm Bull 1995; 43: 1388-90.

12. Žižović I, Stamenić M, Orlović A, Skala D. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale. Journal of Supercritical Fluids 2007; 39, 338-46.

ENGLISH

ANTIBACTERIAL EFFECTS OF MIXTURES OF EXTRACTS OF USNEA, THYME AND ANGELICA OBTAINED USING DIFFERENT TECHNOLOGICAL PROCESSES AGAINST CERTAIN TYPES OF BACTERIA OF IMPORTANCE IN VETERINARY MEDICINE

D. Mišić, Irena Žižović, Jasna Ivanović

Antibacterial effects of plant extracts were examined using mixtures of extracts obtained using different technological processes: usnea extract was obtained using the process of supercritical extraction (NKE), angelica extract was obtained through supercritical extraction processes (NKE) and ultrasound extraction using ethanol (UZ), and thyme extract was obtained using the process of hydrodistillation (HD). Mixtures of the listed extracts were examined in various ratios: U (NKE) and T (HD) in a ratio of 1:1, U (NKE) and T (HD) in a ratio of 7:3, U (NKE), T (HD) and A (NKE) in a ratio of 2:2:1, and U (NKE), T (HD) and A (UZ) in a ratio of 2:2:1. The investigations covered 15 strains of bacteria of the genus *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus*, including the strains MRSA, VRE as well as reference strains of *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 27959 and *S.aureus* ATCC 11632. The antibacterial action of mixes of plant extracts was examined using the microdilution method in bouillon, and the examined mix concentrations were from 1.25 µg/mL to 1280 µg/mL. The strongest antibacterial effect was exhibited by mixes of usnea (NKE) and thyme (HD) in ratios of 1:1 and 7:3 with obtained MIC values from 5 µg/mL to 160 µg/mL, but the MIC value of the listed mixtures for the biggest number of strains amounted to 40 µg/mL. A somewhat weaker effect was exhibited by the other examined extract mixtures with obtained MIC values of 10 µg/mL to 320 µg/mL. Based on the obtained MIC values and the results of previous investigations, it can be concluded that the examined mixtures of plant extracts exhibited a very strong antibacterial effect on the examined bacteria strains.

Key words: extracts, mixtures, antibacterial effect

РУССКИЙ

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ СМЕСЕЙ ЭКСТРАКТОВ ГУБНОГО ЛИШАЯ, ТИМЬЯНА И АНДЖЕЛИКИ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ ПРОТИВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ ЗНАЧИТЕЛЬНЫХ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ

Д. Мишич, Ирена Жижович, Ясна Иванович

В испытаниях антибактериального действия растительных экстрактов использованы смеси экстрактов, полученных применением различных технологиче-

ских процессов а именно: экстракт губного лишая, полученный процессом надкритической экстракции, экстракты анджелики, полученные процессами надкритической экстракции и ультразвуковой экстракции этанолом и экстракт тимьяна, полученны процессом гидродистилляции. Испытываны смеси, приведённых экстрактов в различных отношениях: У и Т в отношении 1:1, У и Т в отношении 7:3, У, Т и А в отношении 2:2:1 и У, Т и А в отношении 2:2:1. Испытанием было охвачено 15 штаммов бактерий из родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*, включая штаммы МРСА, штаммы ВРЕ словно и референтные штаммы *S. rugenes* ATCC 19615, *S. agalactiae* ATCC 27959 и *S. aureus* ATCC 11632. Антибактериальное действие смесей растительных экстрактов испытывано применением микродилуционного метода в бульоне, а испытыванные концентрации смесей от 1,25 µг/мл до 1280 µг/мл. Самое сильное антибактериальное действие показали смеси губного лишая и тимьяна в отношении 1:1 и 7:3 с полученными стоимостями МИС от 5 µг/мл до 160 µг/мл, но стоимость МИС приведённых смесей для самого большого числа штаммов составляла 40 µг/мл. Немного слабее действие показали остальные испытыванные смеси экстрактов с полученными стоимостями МИС от 10 µг/мл до 320 µг/мл. Принимая во внимание на полученные стоимости МИС словно и на основе результатов более ранних исследований, можно сделать вывод, что все испытыванные смеси растительных экстрактов показали очень сильное антибактериальное действие на испытыванные штаммы бактерий.

Ключевые слова: экстракты, смеси, антибактериальное действие