
Marija Nedeljković

Efekat 1,8-cineola na faktore virulencije bakterijskog soja *P. aeruginosa* 15442

Faktori virulencije obuhvataju sve karakteristike mikroorganizama koje omogućavaju efektivnu odbranu od imunskog sistema domaćina i njegovu kolonizaciju. *Pseudomonas aeruginosa* je gram-negativna bakterija, čiji stepen virulencije zavisi od različitih vidova pokretljivosti, sposobnosti za formiranje biofilma, produkcije toksina i pigmentata. Ranijim istraživanjima je pokazano da 1,8-cineol ima izraženo antimikrobno dejstvo i sposobnost inhibicije formiranja biofilma. U ovom radu ispitivan je efekat 1,8-cineola na formiranje i redukciju već formiranog biofilma i bakterijsku pokretljivost soja *P. aeruginosa* 15442. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) 1,8-cineola znosila je 100 µL/mL. Utvrđeno je da 1,8-cineol efikasno suzbija produkciju biofilma i dovodi do degradacije već formiranog biofilma. Tretmanom soja *P. aeruginosa* 15442 1,8-cineolom u subinhibitornoj koncentraciji (MIC/2) uočeno je smanjenje prečnika zona plivajućih i trzajućih pokreta, dok je kod pokreta rojenja zabeleženo povećanje prečnika u odnosu na kontrolu. Testirana supstanca može naći primenu kao komponenta budućeg leka protiv bakterijskih infekcija ili dezinfekcionog sredstva. 1,8-cineol smanjuje virulentnost, pa tako i mogućnost za izazivanje oboljenja kod čoveka.

Uvod

Sposobnost mikroorganizama da izazivaju oboljenja naziva se patogenost. Stepem patogenosti mikroorganizama označava se kao virulencija. Virulencija je rezultat mogućnosti mikroorgani-

zama da adheriraju za domaćina, izvrše invaziju i proizvode različite toksine. Ove karakteristike, koje omogućavaju nastanak oboljenja nazivaju se faktori virulencije. Ako se patogeni mikroorganizmi ne eliminišu iz organizma dolazi do infekcije, što dalje može da dovede do razvoja različitih oboljenja. Da li će izazvati oboljenje ili ne zavisi, pre svega, od osobina samog mikroorganizma, tj. od njegove patogenosti, odnosno virulencije (Petrović *et al.* 2007). Adhezija bakterija na epitelne ćelije predstavlja ključnu fazu u kolonizaciji domaćina (Beachey 1981). Bakterije imaju različite mehanizme adhezije, imunološke ili fizičko-hemijske prirode (Freeter i Jones 1983). Adherencija je povezana sa bakterijskom pokretljivošću, a tokom te faze može doći i do stvaranja biofilмова. Biofilm predstavlja sesilnu zajednicu mikroorganizama pričvršćenu za podlogu. Patogenosti bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u velikoj meri doprinose različiti vidovi pokretljivosti, koji se mogu pratiti testovima pokretljivosti za određivanje plivajućih, trzajućih i pokreta rojenja (Overhage *et al.* 2007).

Pseudomonas aeruginosa je gram-negativna bakterija štapićastog oblika, sa flagelom i nekoliko vrsta pili, koje se obično nalaze na istom polu ćelije. Nastanjuje različite sredine i često je izazivač bolesti kod biljaka i životinja, uključujući i čoveka. Bitna je uloga flagele i pili u razvoju bolesti, s obzirom na to da one omogućavaju različite oblike pokretljivosti. Pokretljivost bakterija je u direktnoj vezi sa invazivnošću (Luzar i Montie 1985).

Biofilmovi *P. aeruginosa* se formiraju od pojedinačnih planktonskih ćelija u složenom i precizno regulisanom procesu (Pratt i Kolter 1998). Bakterije u biofilmu se značajno razlikuju od

Marija Nedeljković (1998), Novi Pazar, Stevana Nemanje 196 B, učenica 4. razreda Gimnazije u Novom Pazaru

MENTOR: Milica Pejčić, master biolog, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Nišu

pojedinačnih planktonskih ćelija. Ćelije koje se nalaze na površini biofilma imaju povećanu ekspresiju algC gena potrebnog za sintezu egzopolisaharida koji su neophodni za povezivanje ćelija (Davies i Geesey 1995). Takođe, pokazano je da se formiranjem biofilma povećava otpornost na antibiotike, u odnosu na otpornost planktonskih ćelija. Mehanizmi antibiotske rezistencije bakterijskih ćelija u biofilmu uključuju ometanje difuzije antibiotika od strane egzopolisaharida, specifičnosti fiziologije bakterijske ćelije i uslove sredine u kojoj se biofilm nalazi (Hoyle i Costerton 1991). Među faktore virulencije bakterije *P. aeruginosa* spada i produkcija pigmenta. Plavičasti pigment piocjanin i fluorescentni piperidin su karakteristični za rod *Pseudomonas* (Meyer i Abdallah 1987).

Utvrđeno je da etarska ulja brojnih biljaka ostvaruju antimikrobno dejstvo na *P. aeruginosa* (Stojanović-Radić *et al.* 2016; Kojić *et al.* 2016; Khan *et al.* 2009; Packiavathy *et al.* 2012), a dalja istraživanja su usmerena na ispitivanje delovanja i mehanizama delovanja njihovih komponenata. 1,8-cineol (eukaliptol) je organsko jedinjenje koje je prisutno u etarskim uljima koja se dobijaju od eukaliptusa, čajnog drveta, ružmarina, bosiljka, žalfije itd. Zastupljenost 1,8-cineola u etarskim uljima značajno varira (Carson *et al.* 2002). Predstavlja zajedničku komponentu etarskih ulja za koja je pokazano da u značajnoj meri inhibiraju formiranje biofilmova (Sandasi *et al.* 2009). Na osnovu podataka dostupnih u literaturi, pretpostavljeno je da je 1,8-cineol komponenta etarskih ulja koja u najvećoj meri doprinosi inhibiciji formiranja biofilmova.

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje efekata 1,8-cineola na formiranje biofilma, redukciju već formiranog biofilma i bakterijsku pokretljivost, kao faktore virulencije soja *Pseudomonas aeruginosa* 15442.

Materijal i metode

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (eng. minimal inhibitory concentration, MIC). Minimalna inhibitorna koncentracija 1,8-cineola određena je metodom serijskih razređenja prema Wiegand *et al.* (2008) sa modifikacijama. Testiran je opseg koncentracija od 100 do 0.78 $\mu\text{L/mL}$ 1,8-cineola. Kao pozitivna

kontrola korišćen je gentamicin u opsegu koncentracija od 0.5 do 0.003 mg/mL. Negativnu kontrolu predstavljao je medijum sa bakterijskom suspenzijom soja *Pseudomonas aeruginosa* 15442 bez dodatka 1,8-cineola ili antibiotika. Kao podloga je korišćen Müller Hinton bujon (MHB). Optička gustina prekonočne kulture na početku ekperimenta je podešavana na ≥ 0.05 na 600 nm. Za detekciju bakterijskog rasta dodat je resazurin koncentracije 0.635 mg/mL i uzorci su dodatno inkubirani 3 h na 37°C. Bakterijski rast dovodi do redukcije resazurina u rezorufin, što rezultuje promenom boje iz plave u ružičastu.

Efekat na produkciju biofilma. Produkcija biofilma testirana je prema protokolu Stepanović *et al.* (2007) sa modifikacijama. Korišćen je tripton soja bujon obogaćen sa 0.5% glukoze. U prvoj fazi ekperimenta je pipetirano po 180 μL podloge sa odgovarajućom koncentracijom 1,8-cineola i 20 μL prekonočne kulture testiranog soja u bunariće mikrotitarske ploče, kako bi se formirao biofilm. Testirane koncentracije 1,8-cineola su: minimalna inhibitorna (MIC), duplo manja (MIC/2) i duplo veća koncentracija od minimalne inhibitorne koncentracije (2MIC). Eksperiment je postavljen u triplikatu. Inkubacija je trajala 24 h na 37°C. Nakon inkubacije podloga je odlivena, a bunarići isprani sa po 200 μL fiziološkog rastvora puferovanog fosfatom (PBS, pH 7.4) i osušeni. Biofilm je fiksiran sa 150 μL metanola tokom 20 min. Zatim je biofilm u svakom bunariću obojen sa po 150 μL 0.1% rastvora kristal violet boje tokom 15 min. na sobnoj temperaturi. Višak boje je ispran pod mlazom česmenske vode. U bunariće je dodato po 200 μL 96% etanola, a nakon 45 minuta na sobnoj temperaturi, iz svakog bunarića je pipetirano po 150 μL u čistu mikrotitar ploču i merena je apsorbance na talasnoj dužini od 595 nm. Apsorbance je proporcionalna debljini biofilma. Inhibicija formiranja biofilmova je stoga izražena u procentima pomoću sledeće formule:

$$I = \frac{A_T}{A_K},$$

gde je A_K – vrednost apsorbance kontrolne grupe, a A_T – vrednost apsorbance tretirane grupe

Efekat na formirani biofilm. U bunarićima mikrotitarske ploče je inkubirano po 200 μL pre-

konočne kulture stare 24 h, kako bi se formirao biofilm. Inkubacija ploče je trajala 24 h na 37°C. Nakon toga podloga je odlivena, a bunarići isprani fiziološkim rastvorom. Zatim je u bunariće dodat svež medijum sa 1,8-cineolom u odgovarajućim koncentracijama. Ploča je inkubirana 24 h na 37°C, a postupak ispiranja, fiksiranja biofilma i merenja je isti kao u prethodno opisanom postupku za određivanje inhibicije formiranja biofilma.

Testovi pokretljivosti. Za testove pokretljivosti kojima su praćeni pokreti plivanja, rojenja i trzanja korišćene su prekonocne kulture sa čvrstog hranljivog medijuma. Testiran je efekat subinhibitorne koncentracije (MIC/2) 1,8-cineola na pokretljivost bakterija. Za pozitivnu kontrolu uzete su vrednosti rasta na podlogama bez dodatka 1,8-cineola, a kao negativna kontrola vrednosti rasta na podlogama sa dodatkom antibiotika u subinhibitornoj koncentraciji. Eseji su rađeni u triplikatu metodom po Rashidu i Kornbergu (2000) sa modifikacijama.

Plivanje bakterija u podlozi omogućavaju pokreti polarne flagele. Korišćen je polučvrsti medijum, tripton bujon (10 g/L triptona, 5 g/L NaCl) sa 0.3% agaroze. Na podloge su inokulisane bakterije iz prekonocne kulture ubodnom ezom, na površinu podloge. Inokulisane podloge su inkubirane 12-14 h na 37°C, nakon čega su izmereni prečnici zona pokreta.

Rojenje se definiše kao brzo, koordinisano kretanje bakterija na polučvrstoj podlozi. Medijum koji je korišćen za esej se sastoji od 5 g/L agaroze sa 8 g/L hranljivog bujona, uz dodatak 5 g/L glukoze. Inokulacija je vršena ubodom ezom na površini podloge, potom su podloge inkubirane 24 h na 30°C.

Trzanje nastaje povezivanjem, a zatim povlačenjem tipa IV. Podloga koja je korišćena u eseju sadržala je 10 g/L triptona, 5 g/L ekstrakta kvasca, 5 g/L NaCl i 10 g/L agaroze. Iz prekonocne kulture je vršena inokulacija ezom do dna podloge u Petri šolji. Posle inkubacije na 37°C u trajanju od 24 h, podloga je uklonjena, nakon čega je usledilo bojenje 0.1% kristal violet bojom. Nakon 1 min. Petri šolja je lagano ispirana destilovanom vodom, što je omogućilo vidljivost pokreta.

Rezultati i diskusija

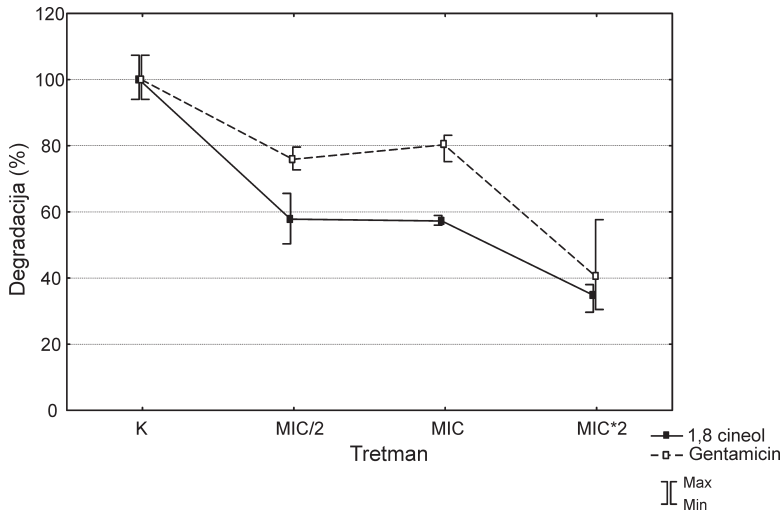
MIC test

Minimalna inhibitorna koncentracija 1,8-cineola za testirani soj iznosi 100 µL/mL. Ranija ispitivanja 1,8-cineola na soju *P. aeruginosa* 15442 pokazala su da je minimalna inhibitorna koncentracija ovog jedinjenja viša u odnosu na MIC etarskih ulja (Hendry *et al.* 2009). Kod nekih sojeva, na primer *P. aeruginosa* 9027, 1,8-cineol uopšte nije pokazao efekat na rast (Bosnić *et al.* 2006; Zaouali *et al.* 2010). Inhibitorski efekat 1,8-cineola znatno je izraženiji kod gram-negativnih u odnosu na gram-pozitivne bakterije (Zaouali *et al.* 2010).

Etarsko ulje pelina, koje sadrži 1,8-cineol u visokom procentu (23.5%) inhibira rast gram-negativne bakterije *Escherichia coli* SY252 u koncentraciji 15 µL/mL (Kojić *et al.* 2016). Niža minimalna inhibitorna koncentracija etarskog ulja pelina u odnosu na koncentraciju samog 1,8-cineola može biti posledica veće osetljivosti *E. coli* u odnosu na *P. aeruginosa*, ali i sinergističkog dejstva 1,8-cineola sa ostalim komponentama etarskog ulja, što je potrebno dodatno ispitati. Ispitivanjem efekta etarskog ulja eukaliptusa (*Eucalyptus* sp.), koji takođe sadrži 1,8-cineol na bakterijski soj koji je korišćen u ovom istraživanju, dobijeno je da minimalna inhibitorna koncentracija iznosi 256 mg/mL (Hendry *et al.* 2009), dok minimalna inhibitorna koncentracija samog 1,8-cineola iznosi 100 µL/mL.

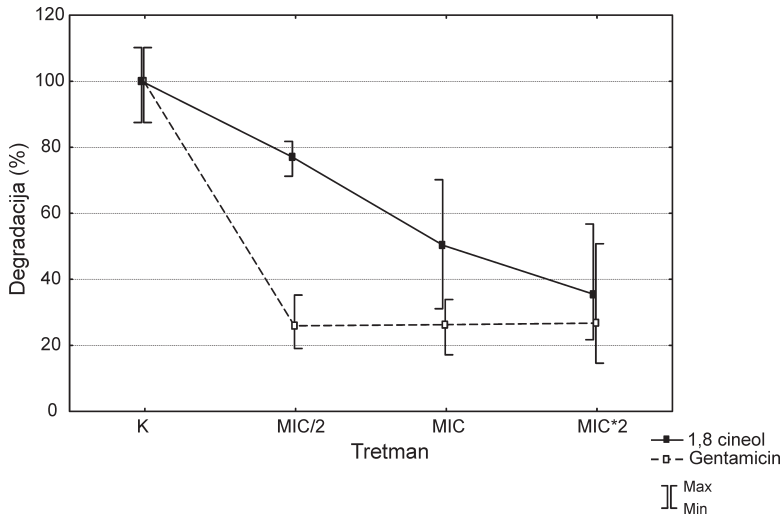
Inhibicija formiranja i efekat na degradaciju već formiranog biofilma

Testirana supstanca u subinhibitorskim i inhibitorskim koncentracijama pokazala se efikasnijom od gentamicina u subinhibitorskim i inhibitorskim koncentracijama u sprečavanju formiranja biofilma (slika 1). Pri tretmanu već formiranog bakterijskog biofilma 1,8-cineolom u koncentraciji duplo manjoj od minimalne inhibitorne, minimalnoj inhibitornoj i duplo većoj od nje, jasno se uočava da dolazi do degradacije biofilma, mada je taj efekat izraženiji pri tretmanu gentamicinom u odgovarajućim koncentracijama (slika 2).



Slika 1. Efekat 1,8-cineola i gentamicina na produkciju biofilma bakterijskog soja *Pseudomonas aeruginosa* 15442

Figure 1. Effect of 1,8-cineol and gentamicin on the production of biofilm of bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* 15442



Slika 2. Efekat 1,8-cineola i gentamicina na degradaciju biofilma bakterijskog soja *Pseudomonas aeruginosa* 15442

Figure 2. Effect of 1,8-cineol and gentamicin on the degradation of biofilm of bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* 15442

Veća efikasnost u sprečavanju nastanka biofilma u odnosu na degradaciju već formiranog se može objasniti uticajem testirane supstance na bakterijsku pokretljivost, koja predstavlja preduslov za adherenciju. Smanjivanjem pokreta smanjuje se i adherencija, pa se usporava produkcija biofilma (Spoering i Lewis 2001). Već formirani biofilm je rezistentniji na antimikrobni agens u odnosu na planktonske ćelije.

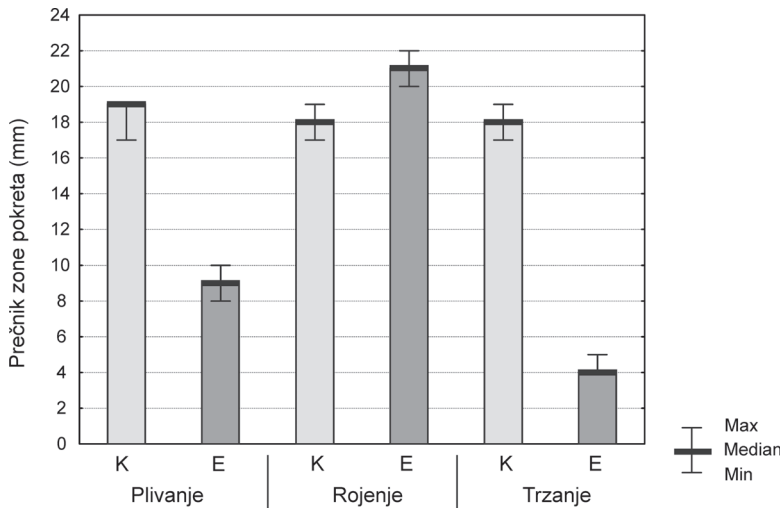
Ispitivanjem efekta etarskog ulja eukaliptusa (*Eucalyptus camaldulensis*) koje sadrži visok procenat 1,8-cineola (64%) pri koncentraciji 200 µg/mL inhibiran je nastanak biofilma za 93.6% (Rasooli *et al.* 2009). Veći procenat inhibicije u odnosu na čist 1,8-cineol može se obja-

sniti ostvarivanjem sinergističkog dejstva sa ostalim komponentama etarskog ulja.

Testovi pokretljivosti

Pri tretmanu soja *Pseudomonas aeruginosa* 15442 1,8-cineolom u subinhibitornoj koncentraciji (MIC/2) 1,8-cineola prečnici zona pokreta plivanja su duplo manji u odnosu na kontrolnu grupu. Kod pokreta rojenja veći prečnik je izmeren u tretmanu i iznosio je 21 mm, dok je u kontroli bio 18 mm. Testirana supstanca ima izražen inhibicioni efekat na pokrete trzanja (slika 3).

Prethodnim analizama je utvrđeno da 1,8-cineol relativno efikasno suzbija produkciju i de-



Slika 3. Efekat subinhibitorne koncentracije 1,8-cineola na pokrete plivanja, rojenja i trzanja bakterijskog soja *P. aeruginosa* 15442
K – kontrola,
E – 1,8-cineol

Figure 3. Effect of the subinhibitor concentration of 1,8-cineol on the movements of (from left) swimming, swarming and twitching of the bacterial strain *P. aeruginosa* 15442
K – control,
E – 1,8-cineol

gradu je već formirani biofilm. Za formiranje biofilma bakterijskog soja *P. aeruginosa* neophodni su pokreti plivanja i trzanja (O'Toole i Kolter 1998), pa su zabeleženi manji prečnici zona ovih pokreta u skladu sa očekivanim. Pokreti plivanja se zasnivaju na flagelarnoj funkciji, koja omogućava hemotaksiju, kretanje, povezivanje i fizičko pričvršćivanje bakterija za površinu (Pratt i Kolter 1998). Pokrete trzanja omogućava pokretanje pili tipa IV koje imaju značajnu ulogu u prijanjanju za podlogu i kolonizaciji (Woods *et al.* 1980).

Pokreti rojenja predstavljaju efikasnu odbrambenu strategiju u prisustvu antimikrobnih sredstava (Butler *et al.* 2009). U prisustvu 1,8-cineola, povećanje zona ove vrste pokreta može se objasniti kao mehanizam odbrane *P. aeruginosa* od antimikrobnog agensa.

Zaključak

Ovim istraživanjem pokazana je antimikrobna aktivnost 1,8-cineola na bakterijskom soju *Pseudomonas aeruginosa* 15442. Takođe, kako je pretpostavljeno, 1,8-cineol inhibira razvijanje biofilma kod ovog soja i isto tako pospešuje degradaciju već formiranog biofilma. S obzirom na povezanost pokreta plivanja i trzanja sa nastankom biofilma, smanjenje prečnika zone ovih pokreta je u skladu sa očekivanim. Prečnici zona pokreta rojenja veći su nakon tretmana 1,8-cineolom u koncentraciji duplo manjoj od minimalne

inhibitorne u odnosu na netretirane kontrolne uzorke. Ovi pokreti predstavljaju mehanizam odbrane bakterija od 1,8-cineola, kao antimikrobnog sredstva. Ova vrsta pokreta ima zaštitnu ulogu i omogućava bakterijama da prežive čak i pri baktericidnim koncentracijama agensa (Butler *et al.* 2009).

Jedinjenje 1,8-cineol može naći primenu kao komponenta potencijalnih lekova protiv bakterijskih infekcija ili dezinfekcionog sredstva. Buduća istraživanja treba da budu usmerena ka ispitivanju mehanizama dejstva 1,8-cineola i efektima na druge, klinički relevantne bakterijske sojeve, a jednu od najvećih prednosti potencijalnog korišćenja ovog jedinjenja predstavlja to što ne eliminiše bakterije, već ih samo onesposobljava da izazovu oboljenje, pa se na taj način izbegava eliminacija korisnih mikroorganizama čije je prisustvo značajno za normalno funkcionisanje organizma.

Literatura

- Beachey E. H. 1981. Bacterial adherence: Adhesin – receptor interaction mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *The Journal of Infectious Diseases*, **143** (3): 325.
- Bosnić T., Softić Dž., Grujić-Vasić J. 2006. Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils. *Acta Medica Academica*, **35** (1): 19.

- Butler T. M., Wang Q., Harshey M. R. 2009. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Science*, **107** (8): 3776.
- Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V. 2002. Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **46** (6): 1914.
- Davies D. G., Geesey G. G. 1995. Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and environmental microbiology*, **61** (3): 860.
- Freter R., Jones G. W. 1983. Models for studying the role of bacteria attachment in virulence and pathogenesis. *Reviews of Infectious Diseases*, **5** (4): 647.
- 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** (6): 1219.
- Hoyle B. D., Costerton J. W. 1991. *Bacterial resistance to antibiotics: The role of biofilms*. Calgary: University of Calgary
- Khan M. S. A., Zahin M., Hasan S., Husain F. M., Ahmad I. 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters in Applied Microbiology*, **49** (3): 354.
- Kojić M., Nedeljković M., Chalabi E. 2016. Efekti etarskih ulja pelena (*Artemisia absinthium*) i čajnog drveta (*Malaleuca alternifolia*) na odabrane klinički značajne bakterijske sojeve. *Petničke sveske*, **75**: 319.
- Luzar M. A., Montie T. C. 1985. Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, **50** (2): 572.
- Meyer J. A., Abdallah M. A. 1987. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology*, **107** (2): 319.
- O'Toole A. G., Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, **30** (2): 295.
- Overhage J., Lewenza S., Marr A. K., Hancock E. W. R. 2007. Identification of Genes Involved in Swarming Motility Using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Mini-Tn5-lux Mutant Library. *Journal of Bacteriology*, **189** (5): 2164.
- Packiavathy I. A. S. V., Agilandewari P., Musthafa K. S., Pandian S. K., Ravi A. V. 2012. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of Cuminum cyminum and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International*, **45** (1): 85.
- Petrović O., Knežević P., Simeunović J. 2007. *Mikrobiologija*, skripta za studente. Beograd: Savremena administracija
- Pratt L. A., Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, **30** (2): 285.
- Rasooli, I., Shayegh, S., Astaneh, S. D. A. 2009. The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. *International journal of dental hygiene*, **7** (3): 196.
- Rashid M. H., Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Science*, **97** (9): 4885.
- Sandasi M., Leonard C. M., Viloen A. M. 2009. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medical plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters of Applied Microbiology*, **50** (1): 30.
- Spoering A. L., Lewis K. I. M. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of bacteriology*, **183** (23): 6746.
- Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Đukić S., Ćirković I., Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, **115** (8): 891.
- Stojanović-Radić Z., Pejčić M., Stojanović N., Sharifi-Rad J., Stanković N. 2016. Potential of *Ocimum basilicum* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against biofilms of *P. aeruginosa* clinical isolates. *Cellular and Molecular Biology*, **62** (9): 27.
- Wiegand I., Hilpert K., Hancock E. W. R. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the

minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, **3** (2): 163.

Woods D. E., Strauss D. C., Johanson J. W. G., Berry V. K., Bass J. A. 1980. Role of pili in adherence to buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, **29** (3): 1146.

Zaouali Y., Bouyaine T., Boussaid M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, **48** (11): 3144.

Marija Nedeljković

Effect of 1,8-cineole on *Pseudomonas aeruginosa* 15442 Virulence Factors

All microorganisms contain virulence factors which enables effective defense from the immune system of the host and its colonization. *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative human opportunistic pathogen, whose level of virulence depends on different types of mobility, capability of forming biofilm, production of toxins and pigments. In order to form a biofilm, swimming and twitching movements are necessary, while swarming movements represent an effective defensive strategy in the presence of

antimicrobial agents. 1,8-cineole is an organic compound that represents common component of essential oils whose emphasized antimicrobial activity and the ability to inhibit biofilm formation was shown in previous research. The aim of this research was to investigate the effect of 1,8-cineole on the formation and degradation of already formed biofilm and bacterial mobility of the *Pseudomonas aeruginosa* 15442 strain. The minimal inhibitory concentration of 1,8-cineole against the bacterial *Pseudomonas aeruginosa* 15442 strain was 100 µL/mL. The tested agent was efficient against biofilm formation and in the degradation of the previously formed biofilm. The subinhibitory concentration of 1,8-cineole decreased the diameter of the zone of swimming and twitching movements, while it increased the diameter of the treatment during the swarming movement. The obtained results are in line with what can be expected, since the termed substance, in this case 1,8-cineole, inhibits swimming and twitching movements, preventing the biofilm formation, while the increase in the swarming zone represents a defense mechanism in the presence of antimicrobial agents. The tested substance can be used as a component of a potential cure against bacterial infections or a disinfectant agent. Future research should be aimed at investigating the mechanisms of 1,8-cineole and its effects on other clinically important bacterial strains, and one of its greatest potentials is that it does not eliminate bacteria, but only disables them to cause disease. 