

---

Teodora Martić

# Inhibicija efluks pumpe bakterijskog soja *Staphylococcus aureus* etarskim uljem lavande i linalolom

---

*Staphylococcus aureus* je gram pozitivna, multirezistentna bakterija koja izaziva nozokomijalne infekcije. Jedan od mehanizama rezistencije ove bakterije zasniva se na aktivnosti efluks pumpe, transmembranskih proteina koji izbacuju antimikrobne agense iz unutarćelijske sredine, smanjujući tako njihovu koncentraciju i efikasnost. Linalol, monoterpenoid zastupljen u etarskim uljima, se akumulira u ćelijskoj membrani, povećava njenu permeabilnost, remeti konzistenciju i rasipa energiju protonske pumpe. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita da li se antimikrobno dejstvo linalola i etarskog ulja lavande zasniva na inhibiciji efluks pumpe i da se utvrdi njihov potencijal za primenu u kombinaciji sa antibiotikom kanamicinom. Određivana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) linalola, etarskog ulja i antibiotika kanamicina. Ispitivanjem tipa interakcije pokazano je sinergističko dejstvo između kanamicina i linalola/etarskog ulja pri najmanjim testiranim koncentracijama obe supstance. Kotretman linalolom/etarskim uljem lavande u najnižim testiranim koncentracijama, MIC kanamicina smanjuje čak osam puta (sa 100 µg/mL na 12.5 µg/mL). Potencijal testiranih supstanci da inhibiraju efluks pumpu je utvrđen testom inhibicije efluksa etidijum-bromida. Tretman linalolom, kao i tretman etarskim uljem lavande dovodi do povećanja početne koncentracije etidijum bromida u odnosu na netretiranu kontrolu.

---

## Uvod

Primena antibiotika u lečenju bakterijskih infekcija započinje sredinom 20. veka otkrićem penicilina. Ubrzo posle uvođenja antibiotika, pojavljuje se i problem nastanka rezistencije mikroorganizama na njih, kao evolucioni odgovor patogenih mikroorganizama. Danas se za svaku grupu antibiotika (betalaktami, fluorohinoloni, aminoglikozidi, tetraciklini) može navesti makar jedan mehanizam rezistencije. Neki od tih mehanizama su: degradacija ili inaktivacija antibiotika, izmena ili zaštita ciljnih molekula u ćeliji ili smanjivanje unutarćelijske koncentracije antibakterijskog

---

Teodora Martić (2000), Novi Sad, učenica 4. razreda Gimnazije „Jovan Jovanović Zmaj” u Novom Sadu

MENTORKE:  
Nevena Vukojičić, ISP  
Bojana Mičić, ISP

agensa pomoću efluks pumpi i smanjenjem permeabilnosti membrane (Costa 2013). Svetska zdravstvena organizacija je 2017. godine napravila listu od dvanaest multirezistentnih bakterijskih sojeva čije tretiranje treba da bude prioritet (Banin *et al.* 2017). Na toj listi se nalazi i *Staphylococcus aureus*, Gram-pozitivna bakterija koja izaziva nozokomijalne infekcije, odnosno infekcije koje se javljaju u zdravstvenim ustanovama. U ćelijskoj membrani *S. aureus* se nalaze transmembranski proteini tzv. efluks pumpe. Fiziološka uloga efluks pumpi je izbacivanje produkata ćelijskog metabolizma, sekrecija faktora virulencije ili ublažavanje posledica oksidativnog i nitrozativnog stresa elimisanjem reaktivnih čestica. S obzirom da aktivnim transportom izbacuju antimikrobne supstance iz ćelije, ovi proteini doprinose bakterijskoj rezistenciji. Energija za aktivni transport se obezbeđuje hidrolizom ATP-a ili koriste energiju hemiosmoze (eng. proton motive force – PMF), odnosno elektrohemijskog gradijenta koji nastaje kretanjem protona kroz ćelijsku membranu. Najpoznatija efluks pumpa *S. aureus* je NorA, sposobna da eliminiše fluorohinolone (npr. norfloksacin i ciprofloksacin), boje (npr. etidijum bromid) i biocide (npr. kvaternarna amonijumova jedinjenja) (Costa 2013). Pored NorA, *S. aureus* ima i druge efluks pumpe koje smanjuju unutarćelijsku koncentraciju tetraciklina, eritromicina, streptomocina i kanamicina (Limaverde *et al.* 2017; Marquez 2005; Kuroda i Tsuchiya 2009). Kanamicin je antibiotik iz grupe aminoglikozida koji se u bakterijskoj ćeliji vezuju za ribozomalnu subjenu 30S i sprečavaju sintezu neophodnih proteina. Floyd *et al.* 2010. godine su pokazali da je ovaj antibiotik supstrat LmrS efluks pumpe pronađene kod *S. aureus*, zbog čega se u ćeliji zadržava manja koncentracija antibiotika od potrebne. Inhibicija efluks pumpi može doprineti smanjenju minimalne inhibitorne koncentracije (eng. Minimal inhibitory concentration – MIC) ili prevazilaženju rezistencije na određeni antibiotik. Inhibicija efluks pumpi se može postići na četiri načina: i) sprečavanjem vezivanja antibiotika za pumpu; ii) ometanjem interakcija unutar same pumpe; iii) ciljanjem izvora energije; iv) sprečavanjem translacije gena odgovornih za sintezu samih efluks pumpi (Kumar *et al.* 2008). Do sada su istraživani mnogi inhibitori efluks pumpi (eng. efflux pump inhibitor – EPI), kako sintetisani, tako i izolovani iz biljaka, ali zbog svoje citotoksičnosti za eukariotske ćelije, nisu uvedeni u praksu (Wang *et al.* 2016; Marquez 2005; Stavri *et al.* 2007).

Poznato je da se lipofilni monoterpenoidi akumuliraju u ćelijskoj membrani, narušavaju integritet membrane i rasipaju energiju hemiosmoze, tj. PMF (Cox *et al.* 1998). Ovakva jedinjenja su prisutna u etarskim uljima različitih vrsta biljaka. U etarskom ulju lavande (*Lavandula* spp.) najzastupljeniji monoterpenoidi su linalol i linalil-acetat (Cavanagh i Wilkinson 2002). Lavanda se koristila u tradicionalnoj medicini zbog svojih antimikrobnih, antidepresivnih i sedativnih svojstava koja su delimično dokazana (Cavanagh i Wilkinson 2002; Lopez *et al.* 2017; Stanković *et al.* 2011). Zbog širokog spektra delovanja etarskog ulja lavande, postoji mogućnost kombinovane terapije sa antibioticima, radi poboljšanja njihovog dejstva (Langeveld *et al.* 2013).

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita da li linalol i etarsko ulje lavande deluju kao inhibitori efluks pumpi *Staphylococcus aureus* i na taj način povećavaju osetljivost ove bakterije na dejstvo antibiotika kanamicina, kao predstavnika grupe aminoglikozidnih antibiotika.

## Materijal i metode

U istraživanju je korišćen bakterijski soj *Staphylococcus aureus* 25923. Nabavljeni su komercijalno dostupni preparati etarskog ulja lavande (*Lavandula angustifolia*), proizvođača MeiLab i linalol S97 proizvođača Crystal Lab.

Odredne su minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika kanamicina, linalola i etarskog ulja lavande. Pomoću prethodno utvrđenih MIC vrednosti ovih supstanci, definisan je opseg koncentracija koji je korišćen za utvrđivanje tipa interakcije dva agensa. Na kraju, ispitan je efekat linalola i etarskog ulja lavande na efluks etudijum-bromida, sa ciljem da se objasni mehanizam interakcije ovih supstanci sa antibiotikom kanamicinom.

## Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Određivanje minimalne koncentracije pri kojoj se ne uočava rast bakterija u Mueller-Hinton bujonu (MHB) rađeno je standardnom metodom u mikrotitar pločama sa 96 bunarića. Testirane su različite koncentracije antibiotika kanamicina, linalola i etarskog ulja lavande. Negativnu kontrolu predstavljala je bakterijska suspenzija *S. aureus* u MHB-u bez dodatka ispitivanih supstanci. Nakon inkubacije od 24 h na 37°C, dodavan je indikator rasta resazurin, koji se, ukoliko postoji rast bakterija, redukuje do rezorufina, usled čega se boja suspenzije menja iz plave u roze.

## Određivanje tipa interakcije dva agensa

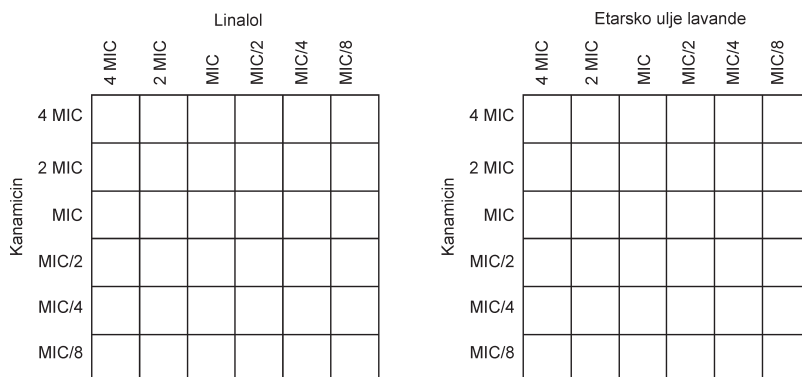
Korišćena je „metoda šahovske table” koja podrazumeva postavljanje različitih koncentracija jedne supstance vertikalno, a druge horizontalno na mikrotitar ploči i testiranje kombinovanih efekata te dve supstance u različitim koncentracijama (Langeveld 2013). Najviša testirana koncentracija za obe supstance bila je četiri puta veća od prethodno utvrđene minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), a najniža osam puta manja od te supstance. Ukupno je testirano 36 kombinacija različitih koncentracija linalola sa kanamicinom i 30 kombinacija različitih koncentracija etarskog ulja lavande i kanamicina (slika 1). Posle 24 sata inkubacije, izračunate su frakcije inhibitorne koncentracije (eng. fractional inhibitory concentration – FIC) za svaku supstancu u kombinacijama koje su pokazale inhibitorno dejstvo na rast bakterija, na sledeći način:

$$\text{FIC supstance A} = \frac{\text{koncentracija supstance A u kombinaciji}}{\text{MIC supstance A}}$$

$$\text{FIC supstance B} = \frac{\text{koncentracija supstance B u kombinaciji}}{\text{MIC supstance B}}$$

$$\text{FIC indeks} = \text{FIC supstance A} + \text{FIC supstance B}$$

Ukoliko je FIC indeks manji ili jednak 0.5 u pitanju je sinergističko dejstvo dva agensa, a ukoliko je između 0.5 i 1 dejstvo je aditivno (Langeveld 2013).



Slika 1. Shematski prikaz mikrotitar ploče za test određivanja tipa interakcije dva agensa

Figure 1. Plate layout for FIC experiment

## Efluks etidijum bromida

Etidijum bromid (EtBr) je jedan od supstrata efluks pumpe. Kada se nađe u ćeliji, EtBr interkalira u DNK, nakon čega počinje da fluorescira, što omogućava praćenje njegovog zadržavanja u ćeliji. Ovaj eksperiment pokazuje da li testirana supstanca inhibira efluks pumpe, ili svoj antimikrobni efekat ostvaruje drugim mehanizmom.

Za određivanje inhibicije efluksa EtBr korišćena je modifikovana metoda Roy *et al.* 2013. Bakterijske suspenzije ( $OD_{600} = 0.3$ ) su napravljene u PBS (eng. Phosphate-buffered saline) puferu bez glukoze. Bakterijskim suspenzijama dodat je EtBr u finalnoj koncentraciji koja ne ometa bakterijski rast (4  $\mu\text{g/mL}$ ) i linalol, odnosno etarsko ulje lavande u koncentracijama koje odgovaraju polovini prethodno utvrđenih minimalnih inhibitornih koncentracija za ove supstance. Nakon inkubacije od 45 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugiranja u trajanju od 3 min na  $12000 \times g$ , bakterije su resuspendovane u svežem PBS puferu sa 0.4% glukoze. Gubljenje fluorescencije je praćeno tokom 30 min na svakih 5 min na 595 nm (ekscitacija na 530 nm).

## Rezultati i diskusija

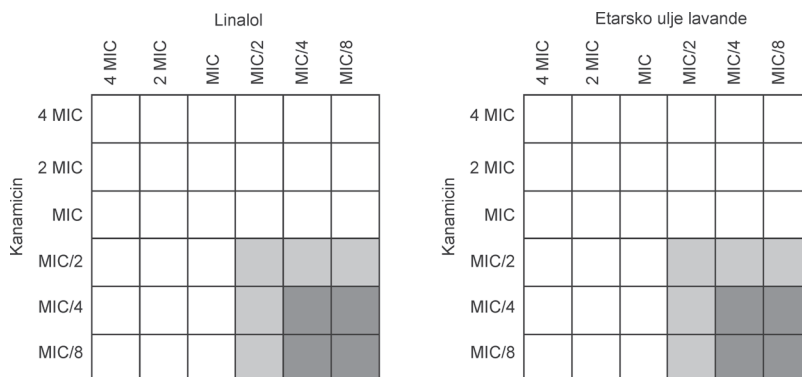
### Minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za kanamicin je 100  $\mu\text{g/mL}$ , za linalol 1.25% komercijalno nabavljenog rastvora nepoznate koncentracije, a za etarsko ulje lavande 10%. Vrednosti za MIC etarskog

ulja lavande u literaturi su između 1000 i 2000 mg/L (Danh *et al.* 2013; Alexopoulos *et al.* 2011; de Rapper *et al.* 2013). Zbog različitih načina ekstrakcije, drugačijeg prinosa ili proizvođača komercijalno dostupnih proizvoda, teško je porediti koncentracije etarskih ulja (u ovom slučaju i linalola) sa drugim istraživanjima. Dobijena vrednost za MIC kanamicina odstupa od podataka pronađenih u literaturi, koji ukazuju na nižu vrednost od 8 µg/mL (Garza-Cervantes *et al.* 2020; Rasamiravaka *et al.* 2018) i 4 µg/mL (Ganiere i Denuault 2009; Pereira *et al.* 2012). Pretpostavljamo da se ova razlika javlja zbog starosti i upitne ispravnosti antibiotika koji je bio na raspolaganju.

## Interakcija ispitivanih agenasa sa kanamicinom

Izračunavanjem indeksa frakcionih inhibitornih koncentracija (FIC) pokazano je da četiri testirane kombinacije linalola i kanamicina imaju sinergističko dejstvo, a pet aditivno. Isto je pokazano i za etarsko ulje u kombinaciji sa kanamicinom (slika 2). Kombinovanjem ove dve supstance sa antibiotikom, MIC kanamicina je smanjena do osam puta u oba slučaja, sa 100 µg/mL na 12.5 µg/mL. Ukoliko se proširi opseg koncentracija ka nižim vrednostima svih supstanci, verovatno je moguće postići i veće smanjenje MIC. U ovom radu najmanja testirana koncentracija za sve agense je iznosila MIC/8.



Slika 2. Shematski prikaz mikrotitar ploče za test određivanja interakcije dva agensa. Tamnija polja predstavljaju kombinacije koncentracija sa sinergističkim dejstvom, a svetlo siva su kombinacije sa aditivnim dejstvom.

Figure 2. Plate layout for FIC experiment. Dark grey cells represent combinations of concentrations with synergistic effects, and light grey cells represent combinations with additive effects.

Langeveld *et al.* (2013) navode dejstva različitih etarskih ulja sa antibioticima na *S. aureus*. Od aminoglikozida, gentamicin pokazuje pozitivne (sinergizam ili aditivnost) interakcije sa etarskim uljem čajnog drveta (*Melaleuca alternifolia*), lipije (*Lippia sidoides*), origana (*Origanum vulgare*) i timijana (*Thymus broussonetii* i *Thymus maroccanus*). Od komponenti etarskih ulja, zapaženo je da timol (monoterpenoidni fenol) ima aditivno dejstvo sa amikacinom i gentamicinom. Smatra se da jedinjenja etarskog ulja (razni monoterpenodi, monoterpeni, fenilpropeni) najčešće

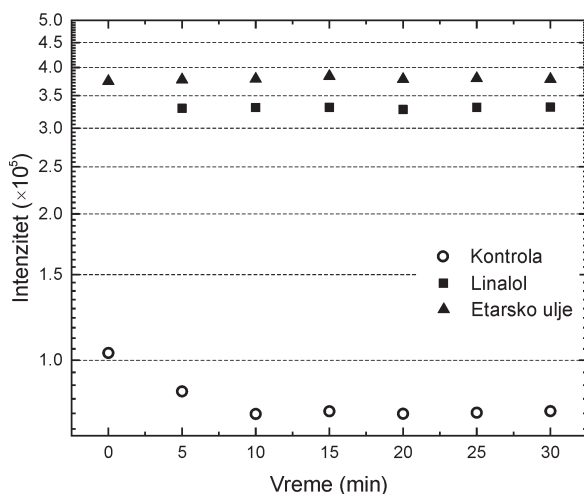
interaguju sa membranom narušavajući njen integritet, dok se za pojedine komponente (karvakrol, cinamaldehyd, eugenol) pretpostavlja da imaju ulogu inhibitora efluks pumpi (Johny *et al.* 2010; Lorenzi *et al.* 2009; Hyldgaard *et al.* 2012). Mehanizam delovanja je poznat za neke komponente etarskih ulja (npr. karvakol, eugenol, timol), dok mehanizam antimikrobnog delovanja linalola ostaje nerazrešen (Bassole *et al.* 2010). Zbog strukturne sličnosti sa gore navedenim jedinjenjima može se pretpostaviti da linalol povećava permeabilnost membrane, utiče na oslobađanje ćelijskog sadržaja, inhibira ćelijsko disanje, ostvaruje interakcije sa proteinima membrane (Bassole *et al.* 2010; Hyldgaard *et al.* 2012).

Poznato je da komponente koje su najviše zastupljene u etarskom ulju najviše doprinose biološkoj aktivnosti tog etarskog ulja (Cavanagh i Wilkinson 2002). Međutim, smatra se da je aktivnost etarskog ulja veća od aktivnosti njegovih komponenti pojedinačno, zbog mogućih interakcija između njih (Herman *et al.* 2015). Bassole *et al.* (2010) su pokazali da linalol ostvaruju sinergističko dejstvo sa timolom, eugenolom i karvakrolom, što ukazuje na to da prisustvo monoterpenoidnih fenola i monoterpenoidnih alkohola povećava antimikrobnu aktivnost etarskog ulja. U našem istraživanju, i etarsko ulje lavande, i linalol koji je u tom ulju najzastupljenija komponenta, doveli su do jednakog smanjenja MIC kanamicina. Ukoliko bi se opseg testiranih koncentracija proširio, možda bi se uočila razlika u njihovom doprinosu dejstvu antibiotika. Ispitivanjem pojedinačnog delovanja još neke od komponenti etarskog ulja lavande (npr. linalil acetat, 1,8-cineol, kamfor), bilo bi moguće steći detaljniji uvid u interakcije između najzastupljenijih komponenti koje najviše doprinose antimikrobnom delovanju ovog etarskog ulja.

## Efluks etidijum bromida

Na slici 3 predstavljen je intenzitet fluorescencije EtBr u zavisnosti od vremena tokom 30 minuta merenja, nakon preinkubacije bakterijske suspenzije u trajanju od 45 min sa EtBr i linalolom, odnosno etarskim uljem lavande u koncentracijama za koje je prethodno pokazano da ne ometaju bakterijski rast (MIC/2). Uočava se da je intenzitet fluorescencije viši u suspenzijama tretiranim linalolom i etarskim uljem, nego u netretiranoj suspenziji. Intenzitet fluorescencije odgovara količini usvojenog i interkaliranog EtBr. Na osnovu rezultata ovog eksperimenta, pretpostavljamo da etarsko ulje lavande i linalol remete rad efluks pumpi i da je usled toga zadržana veća količina EtBr u tretiranim suspenzijama.

Takođe, sa slike 3 se uočava da intenzitet fluorescencije u sve tri grupe ne opada tokom vremena, tj. koncentracija EtBr u ćeliji ostaje ista. S obzirom na preinkubaciju od 45 min, moguće je da se efluks odigrao tokom tog vremena i da je stagnirao do trenutka merenja fluorescencije. Kako bi se moglo zaključivati o efikasnosti rada efluks pumpi u zavisnosti od vremena tokom kog su izložene dejstvu potencijalnih inhibitora, merenje intenziteta fluorescencije treba započeti odmah po dodavanju EtBr i testiranih supstanci.



Slika 3.  
Intenzitet fluorescencije etidijum-bromida tokom vremena

Figure 3.  
Fluorescence intensity of ethidium bromide over time

Poslednji eksperiment je imao za cilj rasvetljavanje mehanizma delovanja linalola i etarskog ulja lavande. Rezultati ukazuju da su ove supstance dobri kandidati za dalja ispitivanja njihove primene kao inhibitora efluks pumpi. Mnogobrojna su istraživanja koje se bave pronalaženjem novih prirodnih ili sintetisanih inhibitora efluks pumpi. Njihovo proučavanje započinje *in vitro* u bakterijskim ćelijama. Od interesa su supstance koje pokazuju sinergističko dejstvo sa antibiotikom čija aktivnost je vrlo smanjena usled aktivnog efluksa. Ispitivanja se često zasnivaju na upoređivanju efekata inhibitora kod mutanata sa genom za izraženu ekspresiju efluks pumpi i kod divljih sojeva (Wang *et al.* 2016). Najjednostavniji način za proveru inhibicije efluksa su metode sa fluorescentnim bojama npr. etidijum bromid, akriflavin i pironin Y (Stavri *et al.* 2007). Najveći problem kod do sad otkrivenih potencijalnih EPI jeste citotoksičnost u ćelijama sisara. Problem citotoksičnosti se generalno javlja pri pokušajima sinteze ili izolovanja novih antimikrobnih supstanci. Koncentracije koje ispoljavaju željeni efekat na bakterijskim ćelijama, najčešće imaju negativan uticaj i na ćelije domaćina. Pored prevazilaženja ovog problema, moraju se obaviti i *in vivo* studije pre nego što se određena supstanca proglasi efikasnim inhibitorom efluks pumpi.

## Zaključak

Ovim istraživanjem je potvrđeno da etarsko ulje lavande i linalol imaju antimikrobno dejstvo na bakterijski soj *Staphylococcus aureus*. Pokazali smo da obe testirane supstance ostvaruju sinergističko dejstvo sa kanamicinom, smanjujući osmostruko minimalnu inhibitornu koncentraciju ovog antibiotika. Rezistencija na kanamicin i njemu srodne antibiotike danas predstavlja značajan problem u tretiranju nozokomijalnih infekcija. Jedan od mehanizama bakterijske rezistencije, podrazumeva da se antimikrobne supstance izbacuju iz bakterijskih ćelija radom efluks pumpi.



Naši rezultati ukazuju na to da etarsko ulje lavande i linalol doprinose efikasnosti kanamicina upravo kroz inhibiciju efluks pumpi.

Testirane supstance bi mogle naći primenu u kombinovanoj terapiji sa antibioticima čije dejstvo je smanjeno usled aktivnog efluksa. Buduća istraživanja treba usmeriti ka potvrđivanju mehanizma delovanja ove dve supstance i ka ispitivanju njihove citotoksičnosti.

---

## Literatura

- Alexopoulos, A., Kimbaris, A. C., Plessas, S., Mantzourani, I., Theodoridou, I., *et al.* 2011. Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*, **17** (6): 399.
- Banin E., Hughes D., Kuipers O. P. 2017. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, **41** (3): 450.
- Bassolé I. H. N., Lamien-Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., *et al.* 2010. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, **15**: 7825.
- Cavanagh H. M. A., Wilkinson J. M. 2002. Biological activities of Lavender essential oil. *Phytotherapy Research*, **16** (4): 301.
- Costa S. S. 2013. Multidrug Efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *The Open Microbiology Journal*, **7** (1): 59.
- Cox S. D., Gustafson J. E., Mann C. M., Markham J. L., Liew Y. C., *et al.* 1998. Tea tree oil causes K<sup>+</sup> leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, **26** (5): 355.
- Danh L. T., Han L. N., Triet N. D. A., Zhao J., Mammucari R., Foster N. 2013. Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by supercritical CO<sub>2</sub>, hexane and hydrodistillation. *Food Bioprocess Technol*, **6**: 3481.
- Floyd L. J., Smith P. K., Kumar H. S., Floyd T. J., Varela F. M. 2010. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54** (12): 5406.
- Ganiere J. P., Denuault L. 2009. Synergistic interactions between cefalexin and kanamycin in Mueller-Hinton broth medium and in milk. *Journal of Applied Microbiology*, **107** (1): 117.
- Garza-Cervantes J. A., Meza-Bustillos J. F., Resendiz-Hernández H., Suárez-Cantú I. A., Ortega-Rivera O. A., *et al.* 2020. Re-sensitizing ampicillin and kanamycin-resistant *E. coli* and *S. aureus* using synergistic metal micronutrients-antibiotic combinations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**: 612.
- Herman A., Tambor K., Herman A. 2015. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Current Microbiology*, **72** (2): 165.



- Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R. L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, **3**: 1.
- Johny A. K., Hoagland T., Venkitanarayanan K. 2010. Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 to antibiotics. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7** (10): 1165.
- Kumar A., Khan I. A., Koul S., Koul J. L., Taneja S. C., *et al.* 2008. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61** (6): 1270.
- Kuroda T., Tsuchiya T. 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, **1794** (5): 763.
- Langeveld W. T., Veldhuizen E. J. A., Burt S. A. 2013. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, **40** (1): 76.
- Limaverde P. W., Campina F. F., Da Cunha F. A. B., Crispim F. D., Figueredo F. G., *et al.* 2017. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food and Chemical Toxicology*, **109**: 957.
- López V., Nielsen B., Solas M., Ramírez M. J., Jäger A. K. 2017. Exploring pharmacological mechanisms of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on central nervous system targets. *Frontiers in Pharmacology*, **8**: 280.
- Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A. F., Berti L., Pages J-M., *et al.* 2009. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53** (5): 2209.
- Marquez B. 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, **87** (12): 1137.
- Pereira M. A., Abreu C. A., Simoes M. 2012. Action of kanamycin against single and dual species biofilms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology Research*, **2** (4): 84.
- Rapper de S., Kamatou G., Viljoen A., Vuuren van S. 2013. The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**: 852049
- Rasamiravaka T., Randrianierenana A., Andrianarisoa B., Raherimandimby M. 2018. Effect of pH on the antimicrobial susceptibility of planktonic-grown *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* ATCC strains. *BMR Microbiology*, **4** (1): 1.
- Roy S. K., Kumari, N., Pahwa S., Agrahari, U. C., Bhutani K. K., *et al.* 2013. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia*, **90**: 140.
- Stanković S. N., Čomić R. Lj., Kocić D. B., Nikolić M. D., Mihajilov-Krstev M. T., *et al.* 2011. Odnos antibakterijske aktivnosti i

hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije. *Hemijska industrija*, **65** (5): 583.

Stavri M., Piddock J. V. L., Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **59** (6): 1247.

Wang Y., Venter H., Ma S. 2016. Efflux pump inhibitors: A novel approach to combat efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Current Cancer Drug Targets*, **17** (6): 702.

---

*Teodora Martić*

## Inhibition of Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* by Lavender Essential Oil and Linalol

*Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterium that causes nosocomial infections. This species has developed different mechanisms of antibiotic resistance, including efflux pumps. The physiological role of efflux pumps has been related to the elimination of endogenous metabolites, the secretion of virulence determinants, and in cell stress responses. However, these transmembrane proteins also eliminate antimicrobial agents from the intracellular environment, reducing their concentration, and therefore their effect. Inhibition of efflux pumps can be achieved by targeting an energy source, in this case proton motive force (PMF). Monoterpenoids, such as linalol, are accumulated in the cell membrane, increasing its permeability, disrupting consistency, and dissipating PMF. Linalol is mostly found in the essential oils of plants, e.g. *Lavandula angustifolia*. The first experiment was conducted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of linalol, essential oil and kanamycin. The type of interaction between these agents was then examined. The results show that a synergistic effect was achieved between kanamycin and linalol/essential oil at the lowest tested concentrations of both substances. With this approach, MIC of kanamycin was reduced eight-fold (from 100 µg/mL to 12.5 µg/mL) in both treatments. Finally, the inhibition of the efflux pump by these substances was tested. The method of ethidium bromide efflux inhibition was performed. Fluorescence loss of intercalated ethidium bromide was determined using a fluorimeter. Results indicate a significant increase in initial EtBr intracellular concentration of the test groups.

