
Karla Ilić

Uticaj brusnice (*Vaccinium vitis idaea* L.) na bakteriju *Serratia marcescens*

Ispitivan je uticaj brusnice (*Vaccinium vitis idaea* L.) na bakteriju *Serratia marcescens*. Rezultatima je potvrđeno da metanolni ekstrakt ploda brusnice pokazuje antibakterijsku aktivnost. Daljim razdvajanjem i izolovanjem komponenti utvrđeno je da najjače antibakterijsko dejstvo pokazuju dva sastojka metanolnog ekstrakta ploda koja su izolovane tankoslojnom hromatografijom. Za dalje ispitivanje ovih jedinjenja neophodno je izvršiti strukturne analize.

Uvod

Serratia marcescens je štapićasta gram-negativna bakterija iz porodice Enterobacteriaceae. Do infekcije ovom bakterijom najčešće dolazi u bolnicama i zdravstvenim ustanovama. *S. marcescens* je odgovorna za oko 2% ukupnih infekcija: krvotoka, donjih disajnih puteva, urinarnog trakta, hirurških rana, kože i mekih tkiva kod odraslih bolesnika. U slučaju oboljenja urinarnog trakta veoma česte posledice su: dijabetes, opstrukcije urinarnog trakta i renalna insuficijencija (Basilio 2009).

Brusnica (*Vaccinium vitis idaea* L.) je vrsta bobičastog voća iz porodice Ericaceae. Ova biljka sadrži organske kiseline, provitamin A, vitamin B (grupa B1, B2 i B3), mnoštvo minerala, polifenole, antocijanine itd. U medicini se brusnica dobro pokazala pri lečenju zapaljenja urinarnog trakta (Vattem *et al.* 2005; Grotevold 2003; Nowack i Schmit 2008).

Cilj ovog rada je ispitivanje antibakterijskog dejstva brusnice i izolovanje jedinjenja koja imaju najveći uticaj na bakteriju *Serratia marcescens*.

Materijal i metode

Ispitivano je antibakterijsko dejstvo vodenog ekstrakta, voćnih kiselina, ekstrahovanih eteričnih ulja i metanolnog ekstrakta brusnice. Metanolni ekstrakt ploda je pušten na tečnu hromatografiju, a frakcija koja je pokazala najveću antibakterijsku aktivnost dalje je razdvajana do čistih jedinjenja tankoslojnom hromatografijom.

Priprema vodenog ekstrakta brusnice

Pripremljeni su vodeni ekstrakti brusnice različitih koncentracija, tako što su različite količine sušenog ploda brusnice (100 mg, 500 mg, 1 g i 2 g) homogenizovane u 5 mL destilovane vode 10 minuta. Po 1 mL svakog rastvora je presut u mikroeprevete koje su zatim centrifugirane 10 minuta.

Način tretiranja bakterija

Napravljena je LA podloga prema upustu iz praktikuma (Gojgić-Cvijović i Vrvić 1994), tako što je 3.75 g agra, 1.25 g ekstrakta kvasca, 2.5 g peptona i 1.25 g natrijum-hlorida rastvoreno u 250 mL vode.

Podloga je naneta u Petri šolje. One su zasejane bakterijom – nanošeno je 0.1 mL prekonocne kulture po petri šolji. Zatim su u hranljivoj podlozi iskopani bunarčići zapremine 100 mikrolitara. U njih su sipani ekstrakti kojima su tretirane bakterije. Nakon nanošenja ekstrakta Petri šolje su ostavljene u frižideru sat vremena, a zatim u inkubatoru na temperaturi od 37°C preko noći.

Karla Ilić (1993), *Zrenjanin, Blagoje Parovića 21, učenica 1. razrada Medicinske škole u Zrenjaninu*

MENTOR: Voin Petrović, doktorant biohemije na Univerzitetu u Beogradu

Utvrđivanje antibakterijskog dejstva brusnice i određivanje koncentracije koja utiče na rast bakterija

Bakterija je zasejana na hranljivoj podlozi u kojoj je iskopano 5 bunarčića zapremine 100 mikrolitara. U svaki je sipano 100 mikrolitara prethodno pripremljenih ekstrakta u koncentracijama 20, 100, 200, 400 g/dm³, dok je u jedan bunarčić sipana destilovana voda kao kontrola. Nakon nanošenja ekstrakta, Petrijeva šolja je stavljena u frižider na sat vremena, a zatim prebačena u inkubator, gde je prenoćila.

Priprema ekstrakta eteričnih ulja

Sastavljena je aparatura za destilaciju. U balon je sipano 300 mL destilovane vode i 100 g brusnice. Kapljice ulja su sa vodom kroz kondenzator destilovale u balon u kom se nalazilo 50 mL heksana. Heksan je od vode odvojen levkom za ekstrakciju i uparen. Zatim je dodat 1 mL destilovane vode kako bi se dobio zasićen rastvor ulja u vodenoj fazi masene koncentracije 0.5 g/dm³ (Hauser 2008).

Izolacija voćnih kiselina

U avanu je isitnjeno 10 g brusnice u rastvoru od 90 mL etil-acetata i 10 mL glacijalne sirćetne kiseline. Dobijena je žućkasta tečnost. Rastvor je uparavan na vakum uparavaču dok nije dobijena sirupasta materija. Dodavan je natrijum-hidroksid dok pH nije iznosio 11.6. Rastvor je ekstrahovan sa tri porcije hlorofoma. Dodata je azotna kiselina. Zatim je rastvor ponovo ekstrahovan hlorofomom i dodati anhidrovani natrijum-sulfat. Rastvor je uparen i dodato mu je 15 mL destilovane vode. Dobijena je žućkasta uljasta materija. Dodavan je koncentrovani natrijum-hidroksid dok žuta boja nije prešla u gornji sloj. pH je iznosio 5.89. Dobijeno je 15 mL ekstrakta rastvorenog u vodi masene koncentracije 0.33 g/dm³.

Priprema metanolnog ekstrakta

Napravljena su dva ekstrakta. 10 g brusnice je isitnjeno u avanu u 100 mL metanola. Rastvor je ostavljen u sušnici na 60°C 5-10 minuta. Zatim je proceden kroz filter papir, uparen i dodato mu je 10 mL vode, dok je drugi samo uparen i tako koncentrovano iskorišćen za tečnu hromatografiju kako bi se utvrdilo koji setovi jedinjenja iz brusnice deluju antibakterijski.

Tečna hromatografija

Spremljena je kolona sa silikagelom G100 kao stacionom fazom i sistemom rastvarača u odnosima etil-acetat:mravlja kiselina:glacijalna sirćetna kiselina:voda = 100:11:11:26, kao mobilnom fazom. Na vrh kolone naneto je 4 mL koncentrovanog metanolnog ekstrakta. Protok je regulisan na kap po sekundi i tako sakupljeno 30 frakcija od po 4 mL. Svaka frakcija je uparena, dodato joj je par kapi metanola i 2 mL vode, stavljena 5 minuta na ultra-zvuk i presuta u dve mikroeprevete. U svakoj od 6 petrijevih šolja sa hranljivim podlogom, iskopno je po pet bunarčića, koji su obeleženi brojevima 1-30, u koje su sipane ovako dobijene frakcije.

Tankoslojna hromatografija (TLC)

Urađen je analitički TLC sa četvrtom frakcijom sakupljenom razdvajanjem na tečnoj hromatografiji koja je prethodno urađena. Korišćen je sistem rastvarača metilen-hlorid:metanol = 9:1 na silikagelu G60-F254. Kada je hromatografija završena rezultati su pregledani pod UV lampom. Mogle su se razlikovati komponente plave i žućkaste boje. Time je utvrđeno da da se frakcija 4 sastoji od više komponenti. Napravljena je ploča za preparativni TLC dimenzija 20×20 cm. Debljina silikagela G60 je iznosila 1 mm. Korišćen je isti sistem rastvarača kao u prethodno odrađenoj hromatografiji (Wagner i Bladt 1996).

Na preparativnoj TLC ploči izdvojila su se četiri jedinjenja koja su međusobno odvojene skidanjem delova silikagela sa ploče na kojima su se nalazila jedinjenja

U silikagel, koji je odvojen zajedno sa jedinjenjima razdvojenim na tankoslojnoj hromatografiji, dodato je po 5 mL metanola. Ovako rastvorena jedinjenja ostavljena su u ultrazvučnom kupatilu 30 minuta, a zatim procedena kroz Bücherov levak. Epruvete su ostavljene otvorene preko noći kako bi metanol ispario, zatim je u svaku dodato po 0.5 mL vode. Na taj način je dobijen rastvor jedinjenja u vodenoj fazi masene koncentracije 5 g/dm³.

Rezultati i diskusija

Rezultati utvrđivanja antibakterijskog dejstva brusnice, odnosno zavisnost veličine zone inhibicije od koncentracije vodenog ekstrakta brusnice data je u tabeli 1.

Tabela 1. Antibakterijsko dejstvo brusnice u zavisnosti od koncentracije ekstrakta kojima su tretirane bakterije

Koncentracija ekstrakta [g/dm ³]	0	20	100	200	400
Prečnik zone inhibicije [mm]	–	10	14	20	24

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da vodeni ekstrakt brusnice pokazuje antibakterijsku aktivnost, koja se povećava sa koncentracijom brusnice, što je i očekivano. Na taj način je dokazano da se u brusnici nalaze jedinjenja, rastvorna u vodi, koja ispoljavaju određeno antibakterijsko dejstvo.

Voćne kiseline. U trima šoljama koje su tretirane voćnim kiselinama brusnice prečnici zona inhibicije iznosili su približno po 20 mm (slika 1), što ukazuje na antibakterijsko dejstvo voćnih kiselina izolovanih iz ploda brusnice.

Eterična ulja. Eterična ulja ekstrahovana iz brusnice nisu formirala nikakvu zonu inhibicije na podlozi na kojoj je bila zasejana *S. marcescens*, što znači da to nisu jedinjenja koja su nosioci antibakterijskog dejstva.

Metanolni ekstrakt. Za pet Petrijevih šolja u kojima je na podlogu *S. marcescens* nanesen meta-



Slika 1. Petri šolja zasejana bakterijom i tretirana voćnim kiselinama brusnice. U centru se može uočiti zona inhibicije u vidu bezbojnog kruga oko kog se nalazi *Serratiae marcescens*.

Figure 1. Petri dish with sown bacteria treated with cranberry fruit acids. In the center of the Petri cup there is a zone of inhibition, a colorless circle surrounded by *Serratiae marcescens*.

anolni ekstrakt brusnice dobijen je prečnik zone inhibicije od 23±1 mm. Pošto se smatra se da određeno jedinjenje masene koncentracije 0.5 g/dm³ u zapremini od 100 mikrolitara deluje kao antibiotik ukoliko pravi prečnik zone inhibicije 20 mm (Gojgić-Cvijović i Vrvić 1994), dobijeni rezultati pokazuju da metanolni ekstrakt brusnice poseduje jako antibakterijsko dejstvo.

Fracije sa tečne hromatografije. Najveću antibakterijsku aktivnost ispoljile su 4, 7, 8. i 23. frakcija. Vrednost prečnika zone inhibicije za ove frakcije date su u tabeli 2.

Tabela 2. Petri šolje zasejane bakterijom i tretirane frakcijama sa tečne hromatografije

Redni broj frakcije	4	7	8	23
Prečnik zone inhibicije [mm]	40	18	18	23

Kao što se vidi iz rezultata frakcije 4. i 23. su napravile najveće zone inhibicije, pa su zasejane su po 3 podloge sa po jednim bunarčićem za obe frakcije kako bi se sa sigurnošću mogli utvrditi prečnici zona inhibicije. Za četvrtu frakciju dobijen je prečnik zone inhibicije 40±2 mm (slika 2), a za 23. – 31±2 mm.

TLC-tankoslojna hromatografija. Kako je četvrta frakcija napravila najveći prečnik zone inhi-



Slika 2. Petrijeva šolja zasejana bakterijom i tretirana četvrtom frakcijom sa tečne hromatografije. U centru se može uočiti zona inhibicije u vidu svetlog kruga.

Figure 2. Petri dish with planted bacteria treated with the fourth fraction from liquid chromatography. In the center there is a zone of inhibition, as light circle.

bicije može se zaključiti da se u njoj nalaze jedinjenja koja uništavaju seraciju. Zbog toga je ova frakcija dalje razdvajana tankoslojnom hromatografijom. Izdvojile su se 4 linije: sivkasta traka nalazi na 0.07 Rf, roza na 0.49 Rf, zelenkasta na 0.53 Rf i žuta od 0.66 Rf do 0.73 Rf. Pošto je analitičkim TLC-om prethodno dokazano da se razdvajana frakcija sastoji od više jedinjenja, na ovaj način su izolovane dovoljne količine jedinjenja (po 1 mg svakog jedinjenja) da se njima tretiraju bakterije.

Sivkasta i žuta traka ispoljile su antibakterijsku aktivnost sa zonama inhibicije prečnika 25 i 20 mm, respektivno. Na ovaj način su pronađena jedinjenja koja su nosioci antibakterijskog dejstva.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da brusnica pokazuje određeno antibakterijsko dejstvo, odnosno da neka jedinjenja iz nje, kao što su voćne kiseline, jedinjenja koja se nalaze u metanolnom ekstraktu, 4. i 23. frakcija, inhibiraju rast bakterije *Serratia marcescens*.

Zahvalnost. Zahvaljujem se Voinu Petroviću, Luki Mihajloviću i Aleksandri Mandić na stručnoj pomoći.

Literatura

Basilio A. J. 2009. *Serratia*. Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/228495-overview> (novembar 2009)

Gojčić-Cvijović G., Vrvic M. M. 1994. *Praktikum za mikrobiološku hemiju*. Beograd: Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Grotewold E. 2003. *The science of flavonoids*. Columbus: Ohio State University

Hauser M. 2008. Isolation of Essential Oils by Steam Distillation. Dostupno na: <http://users.stlcc.edu/mhauser/Essential Oils.pdf>

Nowack R., Schmit W. 2008. Cranberry juice for prophylaxis of urinary tract infections-Conclusions from clinical and research. *Phytomedicine*, **15**: 653.

Vattem D. A., Lin Y., Ghaedian R., Shetty K. 2005. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry*, **40**: 1583.

Wagner H., Bladt S. 1996. *Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin: Springer

Karla Ilić

Influence of Cranberry (*Vaccinium vitis idaea* L.) on Bacteria *Serratia marcescens*

Serratia marcescens is a gram-negative bacteria from the family Enterobacteriaceae. Infection usually occurs in hospitals and health institutions (Basilio 2009).

Cranberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) is a type of fruit from the family Ericaceae. It contains organic acids, vitamin B (group B1, B2 and B3), many minerals, polyphenols, Anthocyanins etc. In medicine cranberry has proven to be useful in the treatment of inflammation of the urinary tract. Our aim was to examine the antibacterial effects of cranberry, determining which compound has the greatest impact on the bacterium *Serratia marcescens*.

Bacteria were sown in LA surface (Gojčić-Cvijović and Vrvic 1994) and treated with 100 micro-liter extract by extract applied in a well dug in the middle of the Petri cups. After that they were put in a fridge for an hour, and in an incubator overnight.

Water cranberry extracts were prepared with different mass concentrations: 20, 100, 200 and 400 g/dm³. It was shown that with increasing concentrations of cranberry its antibacterial activity grows.

Essential oils of cranberry were isolated by distillation. The obtained mass concentration was 0.5 g/dm³. Essential oils did not form a diameter zone of inhibition and thus it was shown that they are not carriers of antibacterial effects of cranberries.

Cranberry fruit acids were isolated. The obtained mass concentrations amounted to 0.33 g/dm³. Three Petri dishes with previously sown bacteria were treated with fruit acids. In two of them there were inhibition zone diameters of 18 mm and 20 mm. From these results it can be concluded that cranberry fruit acids inhibit growth of bacteria *Serratia marcescens*.

Cranberry extract of methanol mass concentration 0.5 g/dm^3 were made. The average length of the inhibition zone diameter was 23 mm. It is considered that at a mass concentration of 0.5 g/dm^3 a 100 micro liter solution acts as an antibiotic if it creates an inhibition zone with a diameter of 20 mm, and the average length of the diameter of the zone of inhibition that is made by a 100 micro liter solution of methanol cranberry extract with a mass concentration of 0.5 g/dm^3 is 22 mm (Gojgić-Cvijović and Vrvić 1994). Based on this, we believe that our results are valid and they show that cranberry has an antibacterial effect. This extract was further separated by liquid chromatography. This gave us 30 fractions 2 of which showed the greatest antibacterial activity – the 4th real diameter of the zone of inhibition of a medium length of 40 mm, and the 23rd

fraction of a medium length of 30 mm in diameter. The system solvent : ethyl acetate : formic acid : glacial acetic acid:water was used in the ratio 100:11:11:26. As the 4th fractions showed greatest antibacterial activity, it was is still separated on TLC. The system solvent:metilen-chloride:methanol was used in the ratio 9:1. The 4 lines were separated, 2 of which inhibit the growth of bacteria – 100 microliter distilled compounds dissolved in the water formed lines ranging from Rf 0.66 to Rf 0.73

Based on the results it can be concluded that cranberry shows antibacterial effects. Preciselly, some of its compounds, such as fruit acids, compounds that are in methanol extract – fractions 4 and 23, inhibit the growth of *Serratiae marcescens*. Further research will be based on the characterization of compounds which were separated on TLC. 