

Uticaj etarskog ulja žalfije, mente i ruzmarina na *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* je jedna je od najznačajnijih bakterija koje prouzrokuju vlažnu trulež biljaka. Imajući u vidu da je patogen širokog spektra biljnih vrsta, pri povoljnim uslovima može izazvati značajnu materijalnu štetu u poljoprivredi. U ovom radu dilucionom metodom je određivana antimikrobna aktivnost etarskih ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), žalfije (*Salvia officinalis*) i mente (*Mentha piperita*) u *in vitro* uslovima na *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Praćen je uticaj četiri koncentracije etarskih ulja: 90%, 75%, 50% i 25%, rastvorenih u dimetil sulfoksidu (DMSO) na promenu optičke gustine tečnih kultura u funkciji vremena. Sva korišćena ulja su ispoljila antimikrobnu aktivnost u svim primenjenim koncentracijama. Najveći inhibitorni uticaj na rast bakterija u uzorcima ostvario je 90%-ni rastvor etarskog ulja mente. Na osnovu dobijenih rezultata smatramo da bi se ova ulja mogla uzeti u obzir kao potencijalna sredstva prirodnog porekla za suzbijanje izazivača vlažne truleži biljaka.

Uvod

Jedan od najznačajnijih patogena koji prouzrokuju bakterijsku vlažnu trulež podzemnih i nadzemnih delova ukrasnog bilja i povrća je *Pectobacterium carotovorum* (Ivanović *et al.* 2009). Uvrštena je među 10 najznačajnijih fitopatogenih bakterija u molekularnoj fitopatologiji na osnovu njenog naučnog i ekonomskog značaja (Mansfield *et al.* 2012).

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (Pec) (stari naziv *Erwinia carotovora* subsp. *caroto-*

vora) je Gram-negativna, nefluorescentna, oksidaza-negativna, katalaza-pozitivna, fakultativno-anaerobna bakterija štapićastog oblika. Patogen je širokog spektra biljnih vrsta, uključujući pojedine biljke od ekonomskog značaja. Svoju virulentnost ostvaruje uglavnom zahvaljujući enzimima (pektat liaze, pektinaze, celulaze i proteaze) koji omogućavaju razgradnju ćelijskog zida biljne ćelije (Alamshahi *et al.* 2010).

Sve je veća potreba za alternativnim načinima suzbijanja ekonomski značajnih patogena. Za razliku od hemijskih mera, ove mere ne bi bile štetne po okolinu i omogućile bi uzgajanje hrane bezbedne po zdravlje. Korišćenje hemijskih komponenti nekih biljnih vrsta, prvenstveno njihovih sekundarnih metabolita, pokazalo je da poseduju dobar potencijal u kontroli biljnih patogena. Među njima se izdvajaju etarska ulja. Etarska ulja su aromatična ulja dobijena iz biljnog materijala (cveta, semena, lišća, ploda, korena). Dokazano je da etarska ulja, osim farmakoloških svojstava, poseduju i antimikrobno dejstvo (Elgayyar *et al.* 2001). Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i njihovih komponenti može varirati. U mnogim slučajevima ova aktivnost je posledica prisustva različitih klasa monoterpena (Stanković *et al.* 2011).

Mogućnost primene etarskih ulja u kontroli biljnih patogena ogleda se u dve osnovne karakteristike. Prva je prirodno poreklo etarskih ulja koje ih čini manje štetnim za čoveka i životnu okolinu. Druga je mali rizik za razvoj rezistentnosti jer su po sastavu etarska ulja kompleks velikog broja jedinjenja sa različitim mehanizmima antimikrobnog dejstva (Duduk *et al.* 2010).

Cilj ovog istraživanja je određivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), žalfije (*Salvia officinalis* L.) i mente (*Mentha piperita* L.) u *in vitro* uslovima na *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Mina Obradović (1994), Beograd, Omladinskih brigada 7e, učenica 4. razreda IX gimnazije „Mihailo Petrović Alas” u Beogradu

MENTOR: Marjan Biočanin, Beograd, student II godine Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Materijal i metode

Test organizam. Za potrebe eksperimenta je korišćen soj *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* iz kolekcije fitopatogenih bakterija Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kultura je održavana na NA podlozi (Knežević i Simić 1997) na temperaturi od 37°C.

Etarska ulja. Ispitan je uticaj komercijalno dostupnih etarskih ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), žalfije (*Salvia officinalis*) i mente (*Mentha piperita*) na Pcc u in vitro uslovima.

Diluciona metoda. Ova metoda se zasniva na diluciji (razređenju) ispitivanog antibakterijskog sredstva tako da se različite koncentracije dodaju u epruvete sa odgovarajućom tečnom podlogom. Svakoju epruvetu se dodaje jednaka količina tečne kulture ispitivanog bakterijskog soja. Bistra podloga nakon inkubacije ukazuje na smanjenu brojnost ili odsustvo bakterija u medijumu usled antimikrobnog dejstva supstance. Merenjem apsorbance zamućene podloge može se odrediti uticaj ispitivane supstance određene koncentracije na brojnost tretiranog bakterijskog soja.

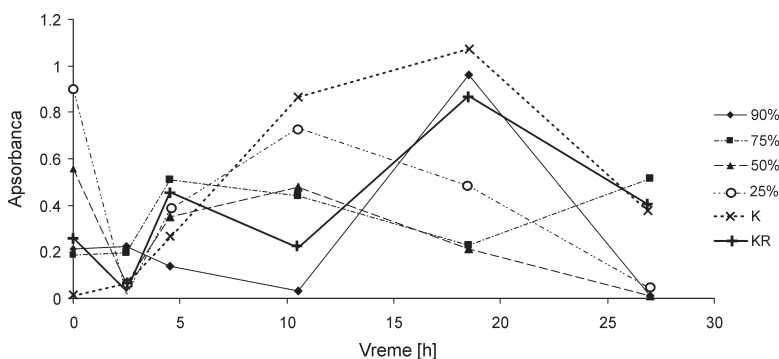
Razblaženja etarskih ulja napravljena su u dimetil-sulfoksidu (DMSO) (Hili *et al.* 1996). U epruvete sa 8 mL tečne LB podloge (10 g NaCl, 5 g ekstrakta kvasca i 10 g kazein hidrolizata, 1 litar destilovane vode) dodato je po 1 mL etarskog ulja u DMSO-u i 1 mL bakterijske suspenzije. Finalna zapremina u svakoj epruveti bila je 10 mL. Razblaženja etarskih ulja pravljenja su u 4 koncentracije: 90% (900 µL ulja i 100 µL DMSO), 75% (750 µL ulja i 250 µL DMSO), 50% (500 µL ulja i 500 µL DMSO) i 25% (250 µL ulja i 750 µL DMSO). Svi tretmani su postavljeni u duplikatu. Za svako razblaženje pripre-

mljen je blank dodavanjem rastvora ulja u tečnu podlogu (bez bakterijske suspenzije). Korišćene su 2 kontrole – hranljivi medijum sa bakterijskom suspenzijom (negativna kontrola) i medijum sa DMSO (kontrola rastvarača). Apsorbance su merene na spektrofotometru (Cecil C2021) na 600 nm nakon 2.5, 4.5, 10.5, 18.5 i 27 sati. Praćena je promena optičke gustine pripremljenih rastvora u funkciji vremena. Promena srednje vrednosti apsorbance u vremenu je grafički predstavljena krivom rasta.

Rezultati i diskusija

Na osnovu rezultata merenja može se uočiti sličan tok promena optičke gustine za sve 4 primenjene koncentracije etarskih ulja ruzmarina, žalfije i mente. U početnim satima merenja apsorbance se smanjuje u odnosu na prvobitno izmerene vrednosti što znači da su etarska ulja delovala antimikrobno i smanjila brojnost bakterija u uzorcima. Optička gustina se zatim povećava zbog rasta bakterija koje su razvile rezistentnost na dejstvo ulja. Kada razgrade sve hranjive materije iz medijuma, bakterije umiru, što za posledicu ima smanjenje optičke gustine.

Na slici 1 prikazana je promena apsorbance kultura sa etarskim uljem ruzmarina tokom vremena. Pri prvom merenju izmerene su različite vrednosti apsorbance za sve rastvore iako je suspenzija dodavana u istoj količini. Mogući uzrok ove nepravilnosti je nedovoljno rastvoreno ulje u hranljivoj podlozi. Ista pojava može se uočiti u vrednostima prvog merenja apsorbance rastvora sa uljem žalfije (slika 2). Među rezultatima izdvaja se minimalna apsorbance 90%-nog razblaženja ulja ruzmarina, koja je izmerena nakon 10.5 sati, dok je za ostale rastvore optička

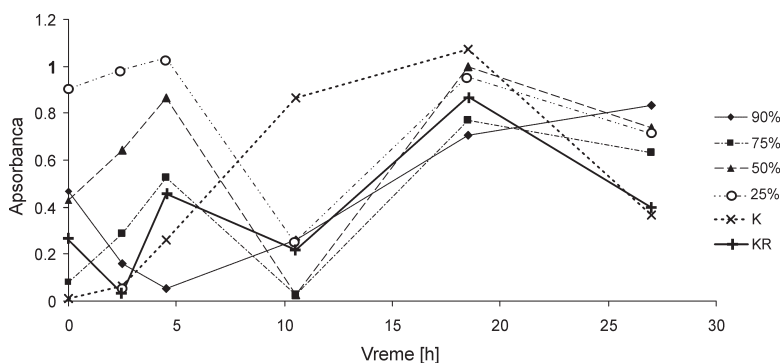


Slika1.

Uticaj etarskog ulja ruzmarina na rast kulture *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*:
K – negativna kontrola
KR – kontrola rastvarača

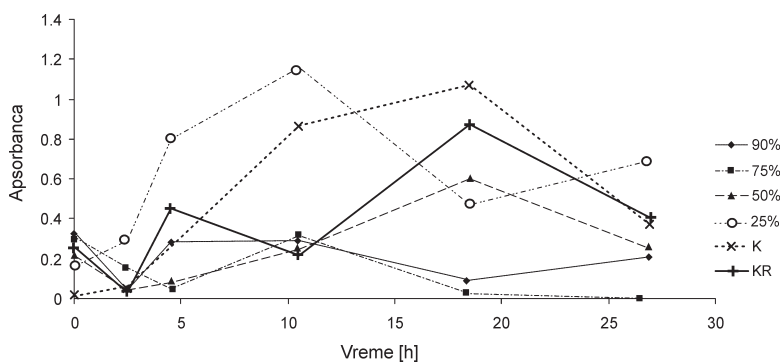
Figure 1.

Antibacterial effect of essential oil from rosemary on *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*:
K – negative control
KR – solvent control



Slika 2.
 Uticaj etarskog ulja žalfije
 na rast kulture
Pectobacterium carotovorum
 subsp. *carotovorum*:
 K – negativna kontrola
 KR – kontrola rastvarača.

Figure 2.
 Antibacterial effect of
 essential oil from sage on
Pectobacterium carotovorum
 subsp. *carotovorum*:
 K – negative control
 KR – solvent control



Slika 3.
 Uticaj etarskog ulja mente
 na rast kultura
Pectobacterium carotovorum
 subsp. *carotovorum*:
 K – negativna kontrola
 KR – kontrola rastvarača

Figure 3.
 Antibacterial effect of
 essential oil from mint on
Pectobacterium carotovorum
 subsp. *carotovorum*:
 K – negative control
 KR – solvent control

gustina bila najniža nakon 4.5 sata. Ovaj rastvor je sadržao najveću dozu etarskog ulja. Može se pretpostaviti da je sporije rastvaranje ulja u tečnom medijumu razlog zašto je bilo potrebno više vremena da ispitivano ulje ostvari svoju antimikrobnu aktivnost.

Ranija istraživanja potvrđuju antimikrobno dejstvo ulja ruzmarina na brojne bakterije (Miguel *et al.* 2011; Bouaziz *et al.* 2009), između ostalog i na *Pectobacterium carotovorum* (Almashahi *et al.* 2010), kao i njegovih isparenja na bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, i *Shigella sonnei* (Božin *et al.* 2007).

Apsorbanca 75%-nog, 50%-nog i 25%-nog razblaženja ulja žalfije raste u prva 4 sata. Nakon toga dolazi do smanjivanja optičke gustine i delovanja ulja. Nasuprot tome 90%-ni rastvor ulja pokazuje inhibitorno dejstvo već posle prvog merenja (slika 2). Moguće obrazloženje porasta optičke gustine rastvora pri početku merenja je odgovor tretiranih bakterija na stres, i pokušaj odbrane od uticaja etarskog ulja.

U plazmidima bakterija mogu postojati geni koji imaju ulogu u formiranju različitih mehanizama odbrane od antibiotika (Bennett 2008). Najčešći oblik odbrane je enzimaska inaktivacija antibiotika. Kako uticaj etarskog ulja nije neutralisan, optička gustina počinje da opada posle 4 sata. Sva tri ulja se razlikuju po svom hemijskom sastavu što bi moglo da bude razlog različitog odgovora bakterije na njihovo dejstvo (Božin *et al.* 2007).

Rezultati merenja za kulture sa etarskim uljem mente su prikazani na slici 3. Razblaženja od 90% i 75% ulja mente su pokazala najizraženiji efekat od 3 proučavana ulja.

Ispitivanja su pokazala da i žalfija i više vrsta mente ostvaruju antimikrobnu aktivnost (Božin *et al.* 2007; Mimica-Dukić *et al.* 2003) što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja

Apsorbanca kontrolnog rastvora (inokulisana hranljiva podloga, bez ulja) se povećava i počinje da opada nakon 18.5 h. Brojnost bakterija u rastvoru za

kontrolu rastvarača je u porastu sve do merenja posle 18.5 h, ali u poređenju sa kontrolom može se primetiti da je došlo do inhibicije. Rastvarač DMSO je pokazao blago antibakterijsko dejstvo, pritom slabije od 50%, 75% i 90%-nih rastvora sva tri ulja. Moguće je da je DMSO doprineo jačem antimikrobnom dejstvu ulja.

Zaključak

Sva korišćena ulja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost u svim primenjenim koncentracijama. Najefikasnije je delovao 90%-ni rastvor etarskog ulja mente koji je pokazao najizraženije inhibitorno dejstvo na razvoj bakterija u uzorku.

Ovo istraživanje je pokazalo da etarska ulja ružmarina, žalfije i mente ispoljavaju antimikrobno dejstvo na soj *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, u *in vitro* uslovima. Na osnovu dobijenih rezultata smatramo da bi se ova ulja mogla uzeti u obzir kao potencijalna prirodna sredstva za suzbijanje izazivača vlažne truleži biljaka. Značaj etarskih ulja u kontroli biljnih patogenata se ogleda u njihovoj bezbednosti po ljude i životnu sredinu, za razliku od sintetičkih sredstava. Za dalja istraživanja neophodno je bolje proučiti mehanizme rezistencije *P. carotovorum*, aktivne supstance ulja koje nose antimikrobno svojstvo, kao i praktične primene ispitivanih ulja, što bi moglo imati poseban značaj u poljoprivredi.

Literatura

- Almashahi L., Hosseini Nezhad M., Panjehkeh N., Sabbagh S. K., Sadri S. 2010. Antibacterial Effects of Some Essential Oils on The Growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. U *The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology Proceedings*, str. 206-212.
- Bennett P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, **153** (S1): S347.
- Bouaziz M., Yangui T., Sayadi S., Dhouib A. 2009. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food and chemical toxicology*, **47** (11): 2755.
- Božin B., Mimica-Dukić N., Samoljik I., Jovin E. 2007. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 7879.
- Duduk N., Obradović A., Ivanović M. 2010. Uticaj etarskih ulja timijana, cimeta i kranfilica na porast micelije *Colletotrichum acutatum*. *Pesticidi i fitomedicina*, **2**: 151.
- Elgayyar M., Draughon F. A., Golden D. A., Mount J. R. 2001. Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants against Selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms. *Journal of Food Protection*, **64** (7): 1019.
- Hili P., Evans C. Sc., Veness R. G. 1996. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, **24** (4): 269.
- Ivanović M., Gašić K., Gavrilović V., Obradović A. 2009. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* – prouzrokovatelj vlažne truleži biljaka kale u Srbiji i Crnoj Gori. *Pesticidi i fitomedicina*, **4**: 287.
- Knežević V. J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji – prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S. V., Machado M. A., Toth I., Salmond G., Foster G. D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **13** (6): 614.
- Miguel G., Cruz C., Faleiro M. L., Simoes M. T., Figueiredo A. C., Barroso J., Pedro L. 2011. *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural product research*, **25** (5): 526.
- Mimica-Dukić N., Božin, B., Soković M., Mihajlović B., Matavulj M. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta medica*, **69** (5): 413.
- Stanković N., Čomić Lj., Kocić B., Nikolić D., Mihajilov-Krstev T., Ilić B., Miladinović D. 2011. Odnos antibakterijske aktivnosti I hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije. *Hemijska Industrija*, **65** (5): 583.

Mina Obradović

Antibacterial Effects of Essential Oils from Sage, Mint and Rosemary on *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* is one of the most important bacteria that cause the wet rot disease in plants. Due to its potential to infect a wide range of plants, it can cause significant damage to food producers by ruining their crops. The antimicrobial activity of the essential oils of rose-

mary (*Rosmarinus officinalis*), sage (*Salvia officinalis*) and mint (*Mentha piperita*) was examined in vitro against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using the dilution method. We observed the influence of four concentrations of oils: 90%, 75%, 50% and 25%, dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) on the change of the optical density of liquid cultures as a function of time. Results were presented as growth curves. All tested oils exhibited antimicrobial activity at all applied concentrations. The 90%-solution of the essential oil of mint showed the highest inhibitory effect on the growth of bacteria. Based on these results we believe that these oils could be considered as potential natural antibacterial agents against bacteria which cause wet rot disease.

